Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# DIE WIRKUNG VON CLOMIPHEN AUF DIE SYNTHESE UND AUSSCHÜTTUNG DER GONADOTROPINE BEI ANDROGENBEHANDELTEN MÄNNLICHEN RATTEN VERSCHIEDENER SEXUELLER REIFESTADIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Helga Bertram, geb. Raus
aus Ingersheim
1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0022

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# DIE WIRKUNG VON CLOMIPHEN AUF DIE SYNTHESE UND AUSSCHÜTTUNG DER GONADOTROPINE BEI ANDROGENBEHANDELTEN MÄNNLICHEN RATTEN VERSCHIEDENER SEXUELLER REIFESTADIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Helga Bertram, geb. Raus
aus Ingersheim
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr.Dr. N. Schwen
Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

E i n l e i t u n g . . . . . 1

P r o b l e m s t e l l u n g . . . . . 5

M a t e r i a l i e n und R e a g e n z i e n . . . . 7

V e r s u c h s a n o r d n u n g . . . . . 9

M e t h o d e n und V e r s u c h s b e -
s c h r e i b u n g . . . . . 10

E r g e b n i s s e

a-c) Einfluß des Testosterons auf den LH-Serumspiegel bei infantilen, pubertären und erwachsenen männlichen Ratten . . . . . 18

d-f) Einfluß des Testosterons auf die LH-Hypophysenkonzentration bei infantilen, pubertären und erwachsenen männlichen Ratten . . . . . 21

g-i) Einfluß des Testosterons auf den FSH-Serumspiegel bei infantilen, pubertären und erwachsenen männlichen Ratten . . . . . 24

k-m) Einfluß des Testosterons auf die FSH-Hypophysenkonzentration bei infantilen, pubertären und erwachsenen männlichen Ratten . . . . . 27

A ) LH-Serumspiegel nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe . . . . . 30

B ) LH-Hypophysenkonzentration nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe . . . . 34

C ) FSH-Serumspiegel nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe . . . . . 38

D ) FSH-Hypophysenkonzentration nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe . . . . 42

D i s k u s s i o n . . . . . 46

Z u s a m m e n f a s s u n g . . . . . 49

L i t e r a t u r . . . . . 50

Für die Anregungen und die Unterstützung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. D. Gupta.

# E i n l e i t u n g

Unter Pubertät versteht man den Zeitraum vom Beginn der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale bis zum Erwerb der Fortpflanzungsfähigkeit. Man weiß, daß die Geschlechtsreife durch die allmählich vermehrte Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse und damit durch einen Anstieg der Sexualhormone im Plasma zustande kommt. Warum der Gonadotropinplasmaspiegel ansteigt, ist noch nicht restlos geklärt.

Lange Zeit glaubte man, daß sich nach der Geburt die androgensezernierenden Leydigschen Zwischenzellen des fetalen Hodens zurückbilden, die Gonaden bis zum Eintreten der Geschlechtsreife inaktiv und erst durch die Gonadotropine zur endgültigen Reifung gebracht würden.

Folgende Tatsachen sprechen gegen diese Annahme: Man hatte gefunden, daß die Gonaden unreifer Tiere durch Gonadotropine künstlich stimuliert werden konnten. Außerdem zeigten Harris und Jacobsohn [15] 1952, daß Hypophysen infantiler Ratten, welche hypophysektomierten erwachsenen Ratten transplantiert worden waren, in der Lage waren, die Gonadenfunktion reifer Tiere aufrechtzuerhalten. Deshalb vermutete man, daß die Hypophysen unreifer Tiere zwar Gonadotropine enthalten, diese aber noch nicht sezernieren.

Eine Läsion im ventralen Hypothalamus verursacht eine vorzeitige Pubertät. Daraus schlossen Donovan und van der Werff ten Bosch [5], daß das Signal für die Hypophyse, vermehrt Gonadotropine auszuschütten, aus dem Hypothalamus kommen muß.

Man hatte zunächst geglaubt, die Zirbeldrüse produziere eine Hemmsubstanz für Gonadotropine, da es bei Tumoren der Zirbeldrüse manchmal zur Pubertas praecox kommt. Eine Hemmsubstanz für die Gonadotropine FSH und LH, welche das Hemmzentrum synthetisieren sollte, konnte allerdings nicht aus

dem Zwischenhirn isoliert werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Pubertas praecox um eine gleichzeitige Schädigung des Hypothalamus, hervorgerufen durch Druckerscheinungen des Epiphysentumors. Schon vor etwa 30 Jahren hatte man die Ansicht vertreten [4], daß der kaudale Hypothalamus die Aufgabe hat, die stimulierende Aktivität des rostralen Hypothalamus auf die Gonadotropinsekretion zu hemmen, und daß durch die Schädigung des kaudalen Hypothalamus die Hemmung aufgehoben wird.
1932 nahmen Hohlweg und Junkmann [16] an, daß für die Hemmung der Gonadotropinsekretion in der Kindheit ein Geschlechtszentrum im Gehirn verantwortlich sein könnte. Dieses Zentrum sollte gegen Gonadenhormone sehr empfindlich sein, und mit Beginn der Pubertät sollte die Empfindlichkeit kontinuierlich abnehmen. So würde die gesteigerte Gonadotropinausschüttung erklärt. Hohlweg und Junkmann machten die zentrale Bedeutung des Hypothalamus für die Steuerung der Hypophyse damit wahrscheinlich und konnten dies auch experimentell nachweisen. Unklar blieb jedoch zunächst der Übertragungsmechanismus auf die Hypophyse, bis im Jahre 1955 [14,25] nachgewiesen werden konnte, daß die hypothalamische Wirkung durch neurohumorale Regulation über das Pfortadersystem an den Hypophysenvorderlappen weitergegeben wird. Die im Zwischenhirn gebildeten Neurosekrete, welche Schally und Mitarbeiter [31] als Releasing- - Hormone bezeichnet hatten, konnten aus dem Zwischenhirn extrahiert und ihre hypophyseotrope Wirkung nachgewiesen werden [27,28,29,30]. 1959 postulierten Donovan und van der Werff ten Bosch [6], daß der Unterschied zwischen unreifen und reifen Tieren in der extremen Empfindlichkeit des infantilen Hypothalamus auf die Gonadenhormone liegt. Schon in der Vorpubertät ist das Hypothalamus - Hypophysen - Gonaden - System voll funktionsfähig [7,17]. Die Gonaden sezernieren genügend Sexualhormone, um die Gonadotropinsekretion zu dämpfen. Beim Einsetzen der Pubertät nimmt die Empfindlichkeit der feed - back - Rezeptoren im Hypothalamus ab; deshalb können die niedrigen Östrogen - bzw. An-

drogenkonzentrationen im Plasma nicht mehr wirksam die Gonadotropinsekretion unterdrücken [9,19]. Es resultiert ein Anstieg des LH - Releasing - Hormons und damit auch der Gonadotropine LH und FSH, was schließlich zu einer vermehrten Stimulation der Sexualhormonproduktion in den Gonaden führt [2,24]. Das System stellt sich auf einen neuen Sollwert ein.

1965 zeigten Ramirez und McCann [23], daß kleinere Dosen von Testosteron ausreichen, um die LH - Ausschüttung bei präpubertären Ratten zu verhindern. Wird Testosteron direkt in den Hypothalamus unreifer männlicher Ratten implantiert, so induziert man eine Hodenatrophie. Verfährt man in der gleichen Weise mit erwachsenen Tieren, dann kommt es zu keiner Wirkung [32]. Daraus schloß man, daß die Pubertät ausgelöst wird durch eine Erhöhung der Schwelle für das Kontrollsystem, also Hypothalamus und Hypophyse, auf das negative feedback - Signal aus den Gonaden. Die Änderung scheint stufenweise vorzugehen [22].

Eine andere Erklärung für die oben erwähnten Beobachtungen wäre ein gesteigerter Metabolismus von Testosteron in pubertären und erwachsenen Tieren. Dies konnte jedoch nicht bewiesen werden, da die Halbwertszeit von markiertem Testosteron in unreifen und reifen Tieren gleich war [36]. Odell et al., van der Werff ten Bosch und Kulin et al. [18,20,37] sehen die Pubertät als einen dynamischen Vorgang an, bei dem es erst zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale kommt, wenn eine kritische Konzentration von Gonadotropin - Releasing - Hormonen erreicht ist.

Die abnehmende Empfindlichkeit der neuralen Strukturen auf die Steroidrückkopplung kann nicht der einzige Faktor sein, der den pubertären Anstieg des Testosteronplasmaspiegels herbeiführt, da relativ konstante Gonadotropinspiegel vorliegen. Odell und Swerdloff [21,33] haben bewiesen, daß die Empfindlichkeit der Testes in der Pubertät gegenüber der Gonadotropinstimulierung gesteigert ist.

Man kann also sagen, daß sich während der Pubertät die Empfindlichkeit der Endorgane auf die gonadotropen Hormone

ändert, sowie die Empfindlichkeit der Hypophyse gegenüber den Gonadotropin - Releasing - Hormonen. Es handelt sich hierbei um einen komplexen Prozeß, der nicht nur durch die Wechselwirkung zwischen Hypophyse und Gonaden, sondern auch durch neuroendokrine Mechanismen zustande kommt (10, 11,12,13).

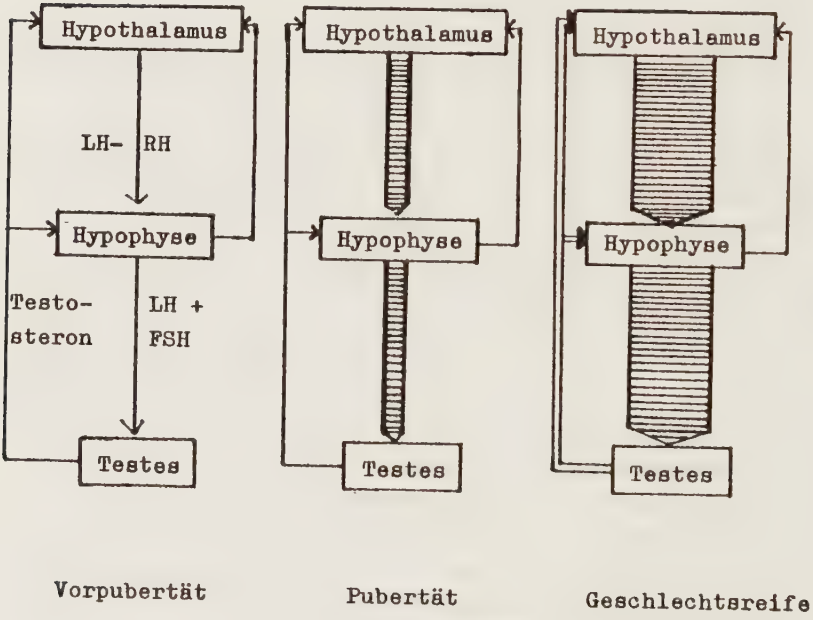



Abb. 1: Regelkreise in verschiedenen Stadien der Geschlechtsreife nach Grumbach [8)]

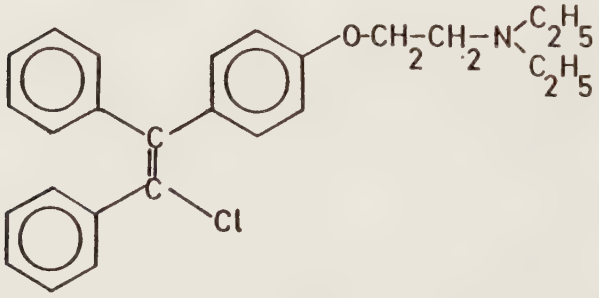
## P r o b l e m s t e l l u n g

Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß der Beginn der Pubertät durch die Änderung der Empfindlichkeit der Hypothalamus - Hypophysen - Gonaden - Achse ausgelöst wird. Man geht einmal davon aus, daß die Gonadotropinkonzentration im Serum in der Pubertät steil ansteigt, zum anderen, daß der negative Rückkopplungsmechanismus der Gonadenhormone auf die Gonadotropinsekretion ausschlaggebend ist. Das bedeutet, der Sexualhormonspiegel im Serum reguliert die Gonadotropinausschüttung in der Weise, daß niedrige Serumspiegel die FSH - und LH - Sekretion steigern, hohe Serumspiegel aber ihre Sekretion hemmen. Im Gegensatz zu Östrogen, welches eine stimulierende oder hemmende Wirkung zeigen kann [3,26], scheint Testosteron nur einen negativen, hemmenden Effekt auf die Gonadotropinausschüttung zu haben. Turner [35] fand im Hypothalamus ein bestimmtes Zentrum, die Eminentia mediana, die einen Schwellenwert von Testosteron mit einer Hemmung der Gonadotropinausschüttung beantwortet.
In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden:

1. Wie lange hält der Testosteronblock bei infantilen, pubertären und erwachsenen Ratten an, denen 25 mg/kg Körpergewicht Testosteronpropionat verabreicht worden ist? 1 bis 5 Tage nach Testosterongabe sollte der LH - und FSH - Spiegel im Serum und in der Hypophyse bestimmt werden.
2. Außerdem sollte die Wirkung von Clomiphen bei den verschiedenen Altersgruppen nach Testosteronblock festgestellt werden.

Clomiphen ist eine antiöstrogen wirksame Substanz, die bei weiblicher Sterilität, hervorgerufen durch hypogonadotrope

anovulatorische Ovarialinsuffizienz, zur Ovulationsauslösung eingesetzt wird. Man nimmt an, daß Clomiphen durch Störung der Rückkopplung zwischen den Sexualhormonen und hypothalamischen Zentren die Synthese und Ausschüttung von LH - Releasing - Hormon und damit von LH und FSH anregt.




Clomiphen

## M a t e r i a l i e n und R e a g e n z i e n

Fa. MERCK, Darmstadt
- Dinatriumhydrogenphosphat x 2 $H_2O$
- Natriumdihydrogenphosphat x 2 $H_2O$
- Natriumchlorid
- Kaliumjodid
- Äthylendinitrilotetraessigsäure
- Chloramin T

BEHRINGWERKE, Marburg/Lahn
- Rinderserumalbumin

WELLCOME Reagents Ltd., Beckenham, England
- Rabbit Serum inactivated
- Precipitating Serum for RIA (Anti - Rabbit Gammaglobulin)

RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham
- Jod - 125 (Na - Salz)

NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DESEASES AND DISORDERS (NIAMDD), Bethesda MD, USA
- Purified Rat Luteinizing Hormone (NIAMDD - Rat LH -I -3)
- Antiserum to Rat Luteinizing Hormone (NIAMDD - Anti - - Rat - LH Serum - 1)
- Reference Preparation (NIAMDD - Rat LH - RP - 1)
- Purified Rat Follicle Stimulating Hormone (NIAMDD - Anti- - Rat FSH - I - 1)
- Antiserum to Rat Follicle Stimulating Hormone (NIAMDD - - Anti - Rat FSH Serum - 6)
- Reference Preparation (NIAMDD - Rat FSH - RP - 1)

SCHERING, Berlin - West
- Testosteronpropionat

MERRELL, Groß - Gerau
- Clomiphencitrat

Elutionspuffer für die Jodierung: pH 7,6

13,2 ml 0,1m $NaH_2PO_4$ x 2 $H_2O$ +
86,8 ml 0,1m $Na_2HPO_4$ x 2 $H_2O$ +
8,7 g NaCl = 0,15m +
100 mg Merthiolat = 0,01 % ad
1 l $H_2O$ = 0,01m Phosphatpuffer

Diluent: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung +
1 % Rinderserumalbumin

Stammpuffer: pH 7,6

3,45 g $NaH_2PO_4$ x 2 $H_2O$ +
0,8737 g $Na_2HPO_4$ x 2 $H_2O$
pH Angleichung mit 1n NaOH
ad 500 ml $H_2O$

Assaypuffer: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung +
18,6 g EDTA +
30 ml Rabbitserum
ad 1 l $H_2O$

2 % BSA - Lösung:

2 g Rinderserumalbumin in Elutionspuffer
für die Jodierung

V e r s u c h s a n o r d n u n g

| Tag | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Versuchs-tiere T:<br>je 14 pp<br>8 p<br>8 a | | | | | | | Versuchstiere T- bzw. TC:<br>je 7 pp<br>4 p<br>4 a |
| Gruppe 5 | 30 T | - | - | - | - | 15 - 15C | " " |
| Gruppe 4 | - | 30 T | - | - | - | 15 - 15C | " " |
| Gruppe 3 | - | - | 30 T | - | - | 15 - 15C | " " |
| Gruppe 2 | - | - | - | 30 T | - | 15 - 15 C | " " |
| Gruppe 1 | - | - | - | - | 30 T | 15 - 15 C | " " |
| absolute Kontrollgr. | - | - | - | - | - | - | 7 pp<br>4 p<br>4 a |

## M e t h o d e n und V e r s u c h s - b e s c h r e i b u n g

Konzentration der Gonadotropine in Hypophyse und Serum vom präpubertären Alter bis zur Geschlechtsreife in männlichen unbehandelten Ratten

In diesem Experiment wurden Ratten des IVANOVAS - Stammes (aus Kißleg/Allgäu) verwendet. 5-6 erwachsene oder 10-14 jugendliche Ratten wurden in Gemeinschaftskäfigen gehalten, Wasser und Nahrung nach Belieben gegeben. Sieben 16 Tage alten präpubertären, vier 33 Tage alten pubertären und vier 90 Tage alten erwachsenen Ratten wurde Olivenöl intraperitoneal injiziert, um eventuelle Lösungsmitteleffekte auszuschließen, und am Tage darauf wurden sie dekapitiert. Die Dekapitation der zuvor mit Chloroform betäubten Tiere wurde mit der Schere durchgeführt. Mittels Trichter wurde das Blut in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Danach blieb das Blut ca 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehen. Vor dem Zentrifugieren wurde mit einem sauberen Glasstab umgerührt, damit sich geronnene Teilchen von der Wand des Zentrifugenröhrchens ablösten. In einer Tischzentrifuge (Fa Christ, Typ UJ 2) wurde bei 3000 U/min. ca 10 - 15 Min. abzentrifugiert. Das Serum wurde sofort abpipettiert und bei - 20°C bis zum Assay aufbewahrt. Nach der Dekapitation wurde außerdem das Schädeldach geöffnet und bis zur Schädelbasis das gesamte Großhirn abgetragen. Der nun freiliegende N. opticus wurde entfernt und die in der Sella turcica liegende Hypophyse von der sie umgebenden Tunica befreit. Danach konnte die gesamte Hypophyse aus der Sella herausgehoben werden. Die Hypophyse wurde sofort in ein abgewogenes Schnappdeckelglas gebracht und in Trockeneis tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei - 20°C gelagert.

Konzentration der Gonadotropine in Hypophyse und Serum von präpubertären, pubertären und erwachsenen Ratten nach Testosterongabe

5 bis 1 Tag vor ihrer Dekapitation wurden je 7 präpubertären (16 Tage alt), 4 pubertären (33 Tage alt) und 4 erwachsenen Ratten (90 Tage alt) 25 mg/kg Körpergewicht Testosteronpropionat, gelöst in Olivenöl, intraperitoneal injiziert. Am Tage ihrer Dekapitation wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

Konzentration der Gonadotropine in Hypophyse und Serum von präpubertären, pubertären und erwachsenen Ratten nach Clomiphengabe bei Testosteronblock

Eine halbe Stunde vor ihrer Dekapitation wurden 1 bis 5 Tage nach Testosteronverabreichung je weitere 7 präpubertäre, 4 pubertäre und 4 erwachsene Ratten intraperitoneal mit 1 mg/kg Körpergewicht Clomiphencitrat, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, behandelt. Nach der Dekapitation wurde wie bereits beschrieben weiterverfahren.

Hypophysenverarbeitung

Die tiefgefrorenen Hypophysen wurden aufgetaut und in ihrem Behälter auf Mikrogramm genau gewogen. Danach wurden sie im Homogenisator (Typ RM 14;Janke+Kunckel KG,Staufen i.Br.) ca 2 Min. lang in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 homogenisiert. Nach Auskippen des Homogenisats wurde das Homogenisatsgefäß mit einem weiteren Milliliter Puffer ausgespült und dieser mit dem Homogenisat vereinigt.

Injektionslösungen

a) 625 mg Testosteronpropionat wurden in 25 ml Olivenöl unter leichtem Erwärmen im Wasserbad gelöst.
b) 7,5 mg Clomiphencitrat (Fa Merrell) wurden in 7,5 ml Saline gelöst.

Verdünnungstest der Hypophysenhomogenisate

Das Homogenisat wurde stufenweise mit Phosphatpuffer pH 7,6 verdünnt: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480. Es wurde ein separater RIA durchgeführt. Für rLH wurden die Verdünnungen 1:30, 1:60 und 1:120, für rFSH die Verdünnungen 1:60, 1:120 und 1:480 eingesetzt. Die Ergebnisse erlaubten eine verläßliche Auswahl derjenigen Konzentrationen, die im Hauptassay eine Ablesung der Werte im empfindlichsten Bereich der Standardkurve ermöglichten. Es wurde schließlich eine Verdünnung von 1:80 gewählt (20 µl Homogenisat + 1580 µl Puffer). 200 µl der Endverdünnung wurden für die Bestimmung eingesetzt.

Radioimmunassay - Methode (RIA, allgemein)

Im Gegensatz zu den Steroidhormonen, die nach ihrer Isolierung und Reinigung mit analytischen Reagenzien nachgewiesen werden können, sind die Proteohormone mangels spezifischer Gruppen in eiweißhaltigem Milieu wie dem Blutplasma chemisch nicht bestimmbar.

Zunächst wurden solche Substanzen mittels ihrer biologischen Wirkung am Versuchstier bestimmt. Die Standardisierung dieser Methode war der Bioassay, der jedoch in den meisten Fällen zu unempfindlich für Konzentrationsmessungen im physiologischen Bereich war.

Durch die Entwicklung des Radioimmunassay können nun Spuren von Protein in biologischen Flüssigkeiten wie Plasma, Serum oder Urin ohne vorherige Abtrennung oder Anreicherung in ng bis pg bestimmt werden. Die Methode beruht darauf, daß in einem immunologischen System das Antigen - in diesem Fall das Glykoprotein FSH bzw. LH - von einem hochspezifischen Proteinmolekül, dem Antikörper, erkannt und in einem Komplex aus beiden Molekülen gebunden wird. Der Antigen - Antikörperkomplex wird mit einem zweiten Antikörper zur Reaktion gebracht. Die Größe dieses Komplexes ermöglicht eine physikalisch - chemische Trennung von den anderen Proteinkomponenten dieses Systems.

Bei der Bestimmung physiologischer Konzentrationen von

Proteohormonen nutzt man die Austauschbarkeit eines radioaktiv markierten Antigens im Antigen - Antikörperkomplex durch ein unmarkiertes Antigen. Es liegt das Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse zugrunde. Man versteht darunter die Konkurrenz zwischen radioaktiven und nicht radioaktiven Molekülen eines Stoffes um Bindungsstellen des Proteins.

$$Ag^{*} + Ag + Ak \rightarrow \begin{cases} Ag^{*} - Ak + Ag \\ Ag - Ak + Ag^{*} \end{cases}$$

Nach einer bestimmten Inkubationszeit hat sich zwischen den Reaktionspartnern ein Gleichgewicht eingestellt, der Antikörper ist weitgehend mit markiertem und nicht markiertem Hormon gesättigt. Dabei bindet der Antikörper um so weniger markierte Moleküle, je mehr nicht markierte anwesend sind. Da die Menge Antikörper und die Menge markiertes Hormon konstant sind, ist das unmarkierte Hormon, dessen Konzentration bestimmt werden soll, die einzige Variable in diesem System.
Für die quantitative Bestimmung eines Hormons wird mit einem zweiten Ansatz verglichen, in welchem Standardverdünnungen mit bekannten Mengen von unmarkiertem Hormon eingesetzt werden. Zur Aufnahme einer Eichkurve werden dem radioaktiv markierten Hormon und dem Antikörper steigende Mengen eines Standards zugesetzt, wobei das Verhältnis Ag - Ak zu Ag immer kleiner wird. Das Ergebnis dieses zweiten Ansatzes wird graphisch aufgetragen. Man erhält so die Standardkurve. Um festzustellen, wieviel von den radioaktiven Hormonmolekülen nach Einstellung des Gleichgewichts an den Antikörper gebunden sind, muß aus dem Inkubationsgemisch der antikörpergebundene Anteil vom freien abgetrennt werden. Dies geschieht durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der den Antigen - Antikörperkomplex präzipitiert.

Jodierung des Hormons (Chloramin-T-Methode)

Reihenfolge des Pipettierens:

1. 2 µg des Hormons in 20 µl Puffer

2. 20 µl des 0,5 m Phosphatpuffers
3. 0,5 mCi $J^{125}$ (entsprechend 5 µl Lösung)
4. 10 µl Chloramin - T - Lösung (125 mg in 50 ml 0,01 m Phosphatpuffer gelöst)
5. Reaktionszeit 1 Minute; dabei auf einem Schüttelgerät Typ Rotamixer, Fa Hock & Tucker HT, schütteln
6. 30 µl Natriumpyrosulfitlösung (125 mg gelöst in 50 ml 0,01 m Phosphatpuffer)
7. 100 µl Transferlösung
8. Übertragung des Reaktionsgemisches auf eine Sephadexsäule (G-75 - Füllung)
9. Reaktionsgefäß mit 2 mal 20 µl 12% BSA - Lösung nachspülen und ebenfalls auf die Sephadexsäule übertragen
10. Sephadexsäulenfüllung mit 0,01 m Phosphatpuffer eluieren
11. Fraktionen von je 1 ml sammeln (Vorlage 0,5 ml 2% BSA--Lösung

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich eine Elutionskurve mit zwei Peaks. Der Hauptpeak bedeutet das radioaktiv markierte Hormon, während der zweite Peak - auch Salzpeak genannt - Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen sowie freies radioaktives Jod darstellt.

Radioimmunassay - Methode (speziell)

Es wurden im wesentlichen die vom National Institute of Health, Bethesda MD (USA), gegebenen Richtlinien übernommen. Die folgenden Schritte wurden durchgeführt:

1. Als Assayröhrchen wurden Plastikreagenzröhrchen zum einmaligen Gebrauch verwendet.
2. Diluent in genügender Menge für ein Gesamtreaktionsvolumen von 800 µl wurde zugegeben.

3a. Weiter wurde das zu untersuchende Serum (100 bzw. 200 µl) bzw. das verdünnte Hypophysenhomogenisat dazupipettiert.

3b. die Standardverdünnung der Reference Preparation von 500 ng bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen, daß eine

kurve gezeichnet werden konnte.

4. 200 µl des Antiserums gegen das jeweilig zu messende Hormon in einer Arbeitsverdünnung von 1:10000 bis 1:15000 in mit 3% normalem Rabbit - Serum versetzten Phospatpuffer.
5. Dieses Gemisch wurde auf einem Rotamix - Schüttler kurz aufgeschüttelt und 24 Std. bei 4°C inkubiert.
6. 100 µl jodiertes Hormon in einer Verdünnung von 40000 counts/200 sec wurde zugegeben.
7. Nach kurzem Schütteln des Reaktionsgemisches 24 Std. bei 4°C inkubiert.
8. Nach dieser Zeit wurden 200 µl genügend (meist 1:12) verdünntes Anti - Kaninchen - γ - Globulin dazugegeben, um die maximale Präzipitation des an den Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen. Verdünnung mit 0,01 m Phosphatpuffer.
9. Nach kurzem Schütteln des Gemisches wurde 3 Tage bei 4°C inkubiert.
10. Zentrifugation bei 2000 x g für 2 Std.. Der Überstand wurde abgekippt. Das Präzipitat wurde zur Messung der Radioaktivität in einen Packard bzw. Tracerlab Gammazähler überführt.
11. Die Röhrchen mit den unbekannten Mengen des Hormons wurden mit den Counts der Standardverdünnung der Reference Preparation verglichen. Dazu wurde graphisch eine Kurve dieser Standardwerte konstruiert, und die Werte der unbekannten Proben direkt aus dieser Kurve abgelesen. Die Ergebnisse werden als ng NIAMDD - Rat LH-RP-1 bzw. ng NIAMDD - Rat FSH-RP-1 pro ml Serum ausgedrückt.

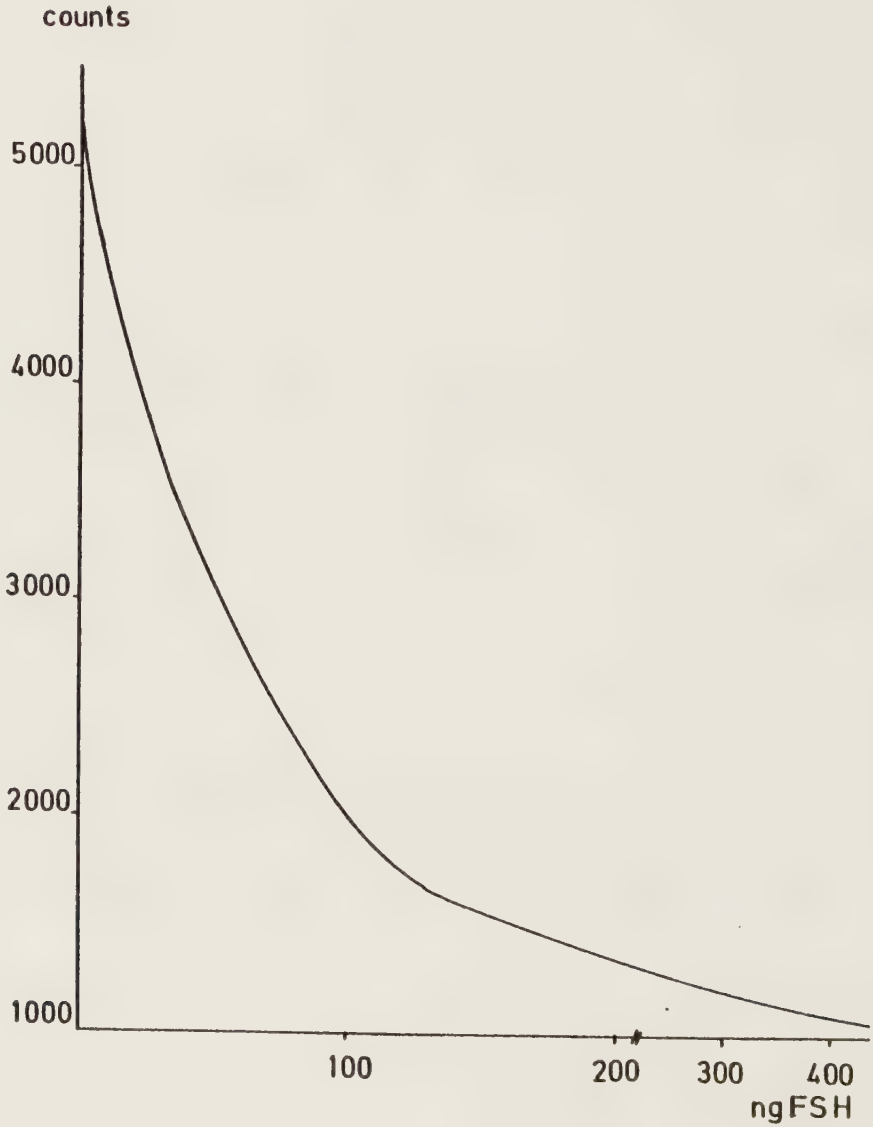



Abb. 2: Kurve der Standardwerte für FSH

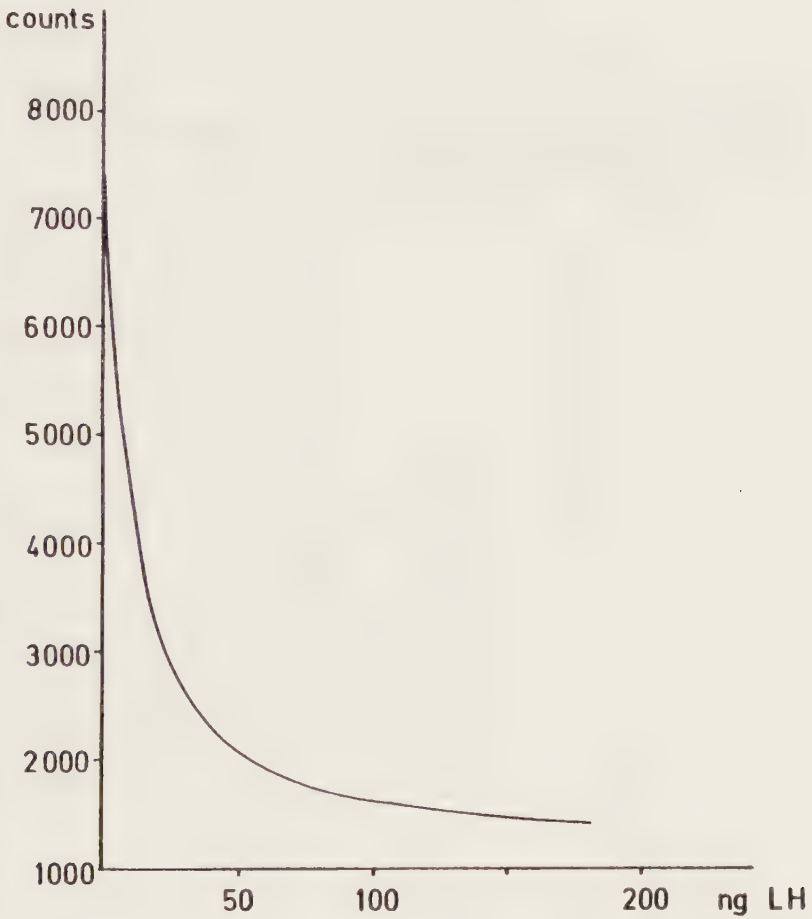
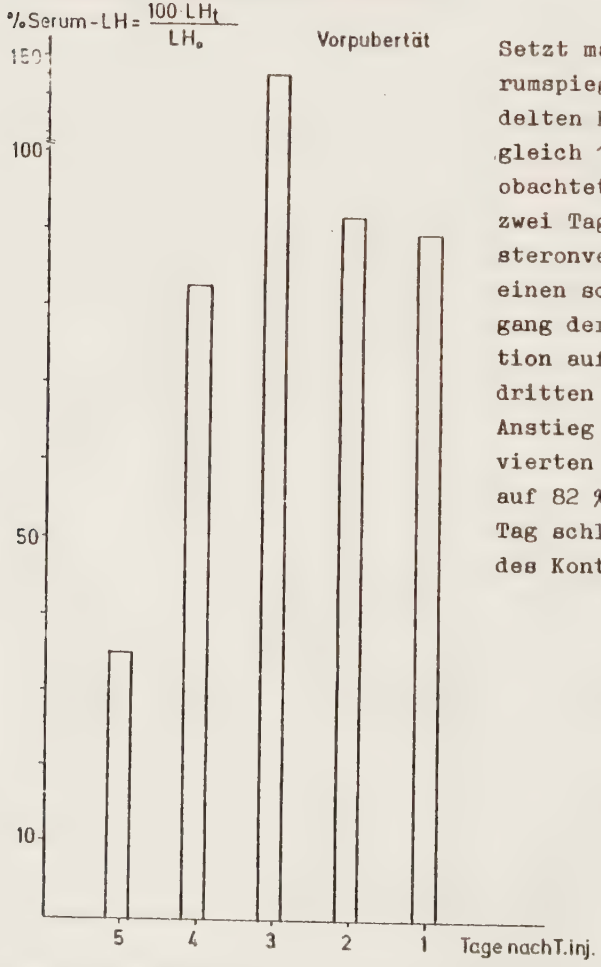



Abb. 3: Kurve der Standardwerte für LH

## E r g e b n i s s e

a) Einfluß des Testosterons auf den LH - Serumspiegel bei infantilen männlichen Ratten




Setzt man den LH - Serumspiegel der unbehandelten Kontrollgruppe gleich 100 %, so beobachtet man ein und zwei Tage nach Testosteronverabreichung einen schwachen Rückgang der LH - Konzentration auf etwa 90 %, am dritten Tag sogar einen Anstieg auf 140 %, am vierten Tag eine Senkung auf 82 % und am fünften Tag schließlich auf 35 % des Kontrollwertes.

Abb. 4: Vergleich des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock mit Kontrollspiegel bei infantilen Ratten

b) Einfluß des Testosterons auf den LH - Serumspiegel bei pubertären männlichen Ratten

Hier zeigt sich bereits einen Tag nach Testosterongabe ein Rückgang der LH - Konzentration auf 15 %. bis zum vierten Tag kommt es zu einem allmählichen Anstieg bis auf etwa 30 %, fünf Tage danach fällt der LH - Spiegel im Serum wieder auf 25 % des Kontrollwertes.

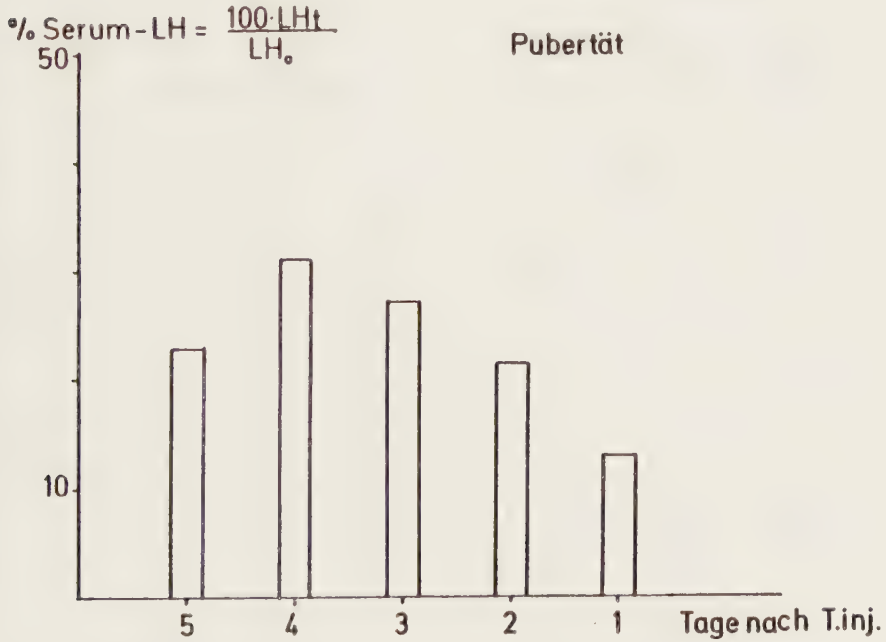



Abb. 5: Vergleich des LH - Serumspiegels nach Testosteron-block mit Kontrollspiegel bei pubertären Ratten

c) Einfluß des Testosterons auf den LH - Serumspiegel bei erwachsenen männlichen Ratten

Auch hier kommt es schon einen Tag nach Testosteronverabreichung zu einer Dämpfung des LH - Wertes auf 16 %, nach zwei bis vier Tagen liegt die Konzentration zwischen 24 und 17 %, am fünften Tag fällt sie auf 15 % des Kontrollwertes.

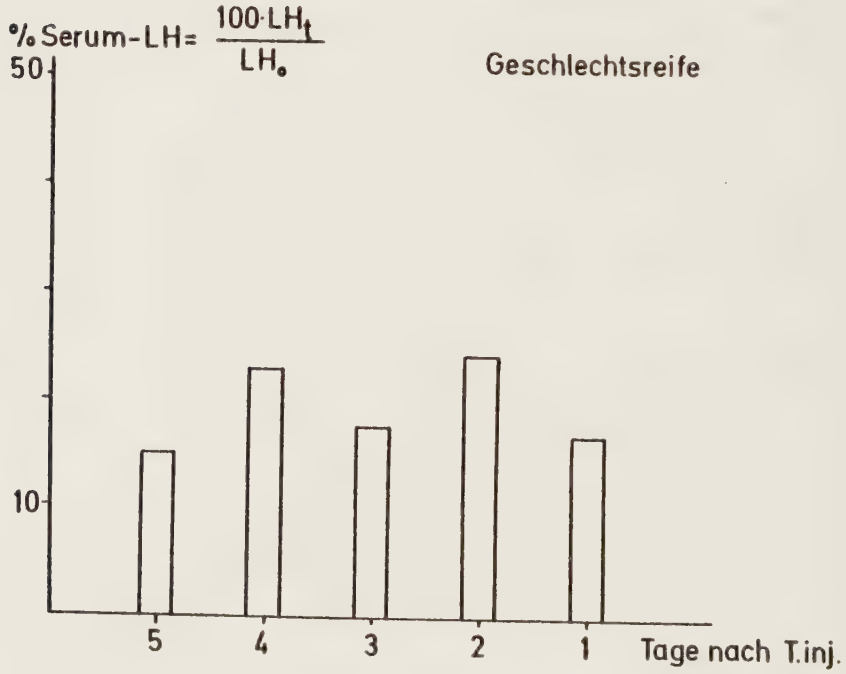



Abb. 6: Vergleich des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock mit Kontrollspiegel bei erwachsenen Ratten

d) Einfluß des Testosterons auf die LH - Hypophysenkonzentration bei infantilen männlichen Ratten

Einen Tag nach Testosterongabe geht die LH - Konzentration auf 35 % zurück, sinkt bis zum vierten Tag weiter ab bis auf 8 % und steigt am fünften Tag wieder leicht auf 12 % an.

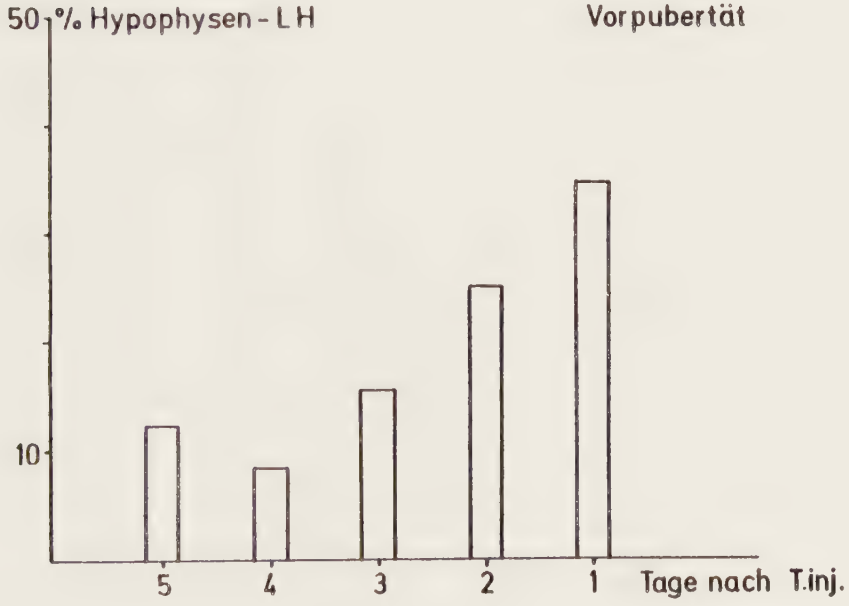



Abb. 7: Vergleich der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei infantilen Ratten

e) Einfluß des Testosterons auf die LH - Hypophysenkonzentration bei pubertären männlichen Ratten

Hier sinkt die Konzentration einen Tag nach Testosteronapplikation auf 70 % der Ausgangskonzentration , fällt bis zum vierten Tag ab auf 20 % und steigt am fünften Tag auf 48 % an.

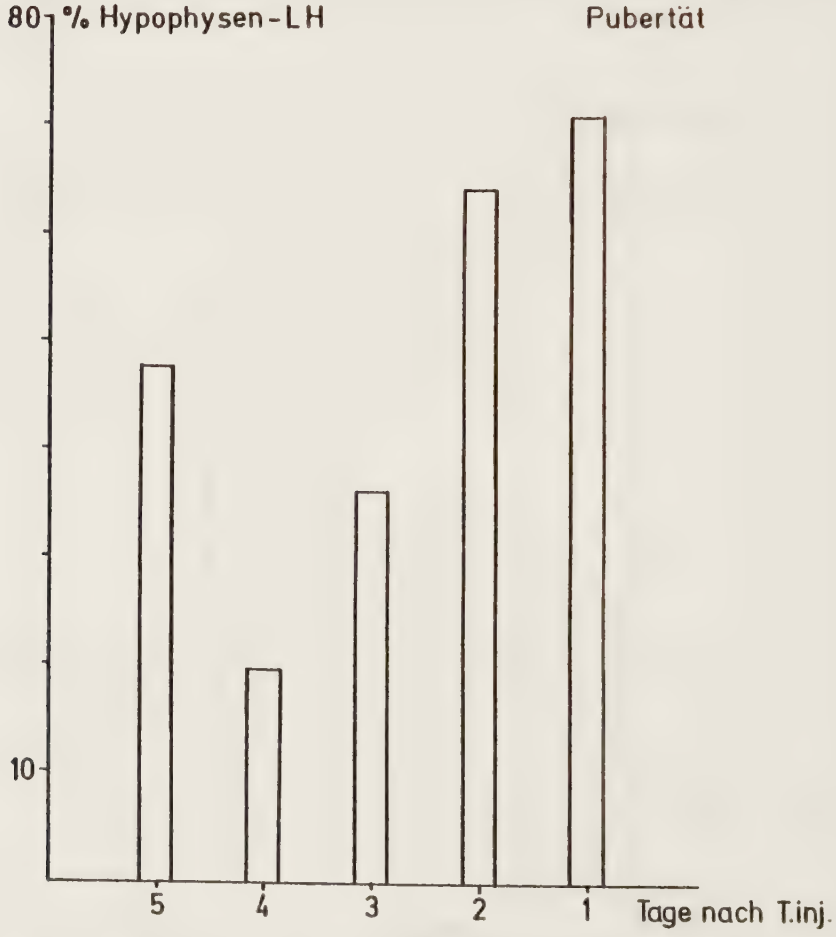



Abb. 8: Vergleich der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei pubertären Ratten

f) Einfluß des Testosterons auf die LH - Hypophysenkonzentration bei erwachsenen männlichen Ratten

Man beobachtet einen Tag nach Testosteroninjektion ein Absinken auf 75 %, am zweiten Tag kommt es zu einem Anstieg auf 105 %, vom dritten Tag an fällt die Konzentration bis zum fünften Tag steil ab auf 35 % des Kontrollwertes.

Abb. 9: Vergleich der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei erwachsenen Ratten

g) Einfluß des Testosterons auf den FSH - Serumspiegel bei infantilen männlichen Ratten

Hier zeigt sich einen Tag nach Testosteronbehandlung ein geringes Absinken der FSH - Konzentration im Serum auf 98 %, am zweiten Tag fällt der FSH - Spiegel auf 85 % und steigt am dritten Tag wieder an auf 107 %. Erst am vierten und fünften Tag kommt es zu einer Dämpfung auf 65 bzw. 62 %.

Abb. 10: Vergleich des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock mit Kontrollspiegel bei infantilen Ratten

h) Einfluß des Testosterons auf den FSH - Serumspiegel bei pubertären männlichen Ratten

Am ersten Tag fällt die Konzentration an FSH auf 85 % ab, wächst am zweiten Tag auf 103 % an, am dritten Tag erreicht sie wieder 85 %, fällt am vierten Tag weiter auf 73 % und steigt am fünften Tag auf fast 90 % an.

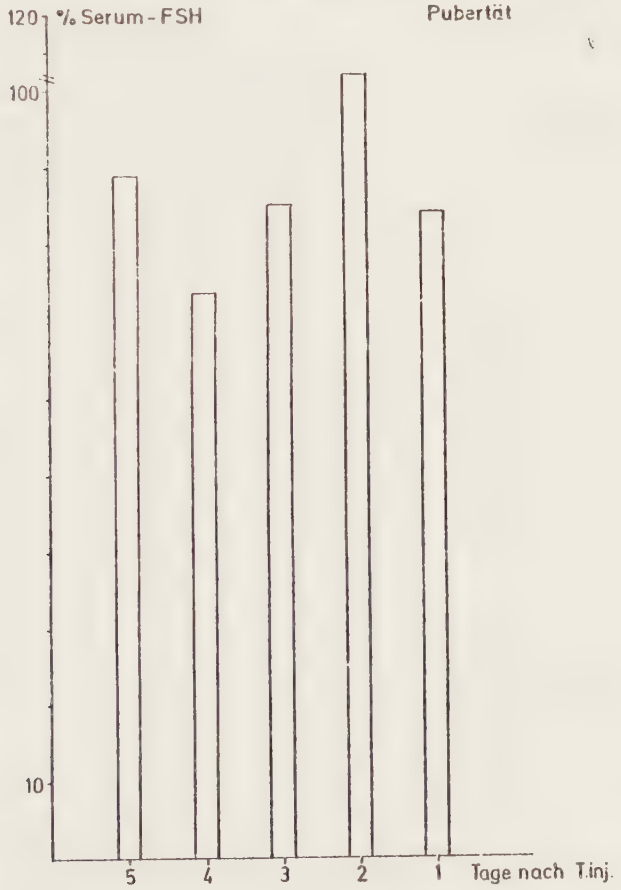



Abb. 11: Vergleich des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock mit Kontrollspiegel bei pubertären Ratten

i) Einfluß des Testosterons auf den FSH - Serumspiegel bei erwachsenen männlichen Ratten

Am ersten und zweiten Tag nach Testosterongabe sinkt der FSH - Spiegel nur unwesentlich auf etwa 97 % ab. Am dritten und vierten Tag liegt er bei 56 % und steigt am fünften Tag wieder auf 66 % an.

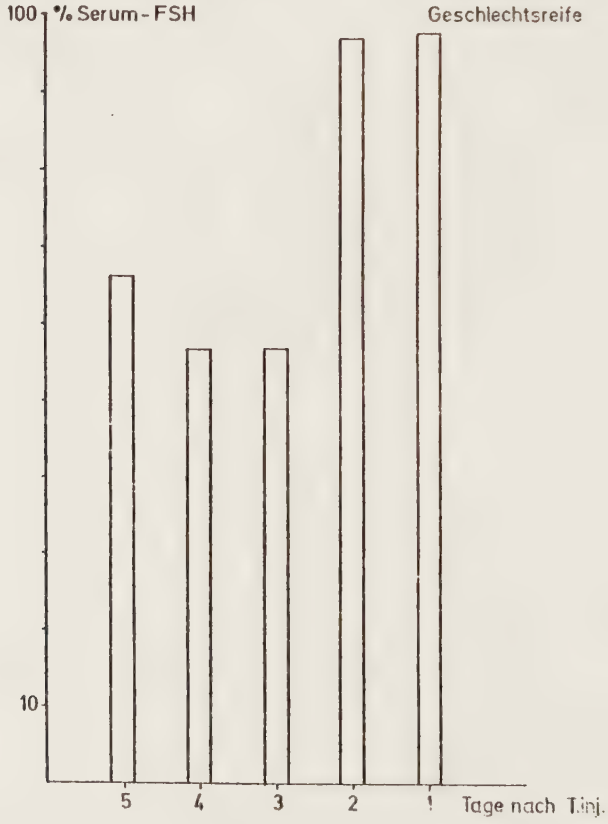



Abb. 12: Vergleich des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock mit Kontrollspiegel bei erwachsenen Ratten

k) Einfluß des Testosterons auf die FSH - Hypophysenkonzentration bei infantilen männlichen Ratten

Hier beobachtet man schon einen Tag nach Testosteronverabreichung einen Rückgang der FSH - Konzentration auf 36 %, vom zweiten bis vierten Tag liegen die Werte zwischen 33 und 43 %, am fünften Tag fällt der Wert schließlich auf 26 %.

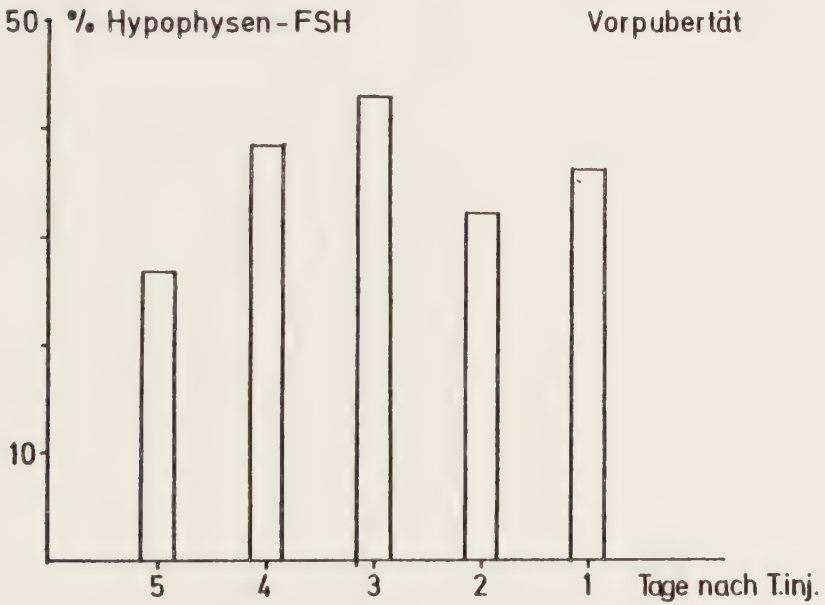



Abb. 13: Vergleich der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei infantilen Ratten

1) Einfluß des Testosterons auf die FSH - Hypophysenkonzentration bei pubertären männlichen Ratten

Einen Tag nach Testosteronbehandlung zeigt sich ein Rückgang der FSH - Konzentration auf 68 % der Kontrollkonzentration, bis zum vierten Tag sinkt der Wert allmählich auf 32 % und steigt am fünften Tag wieder auf 57 % an.

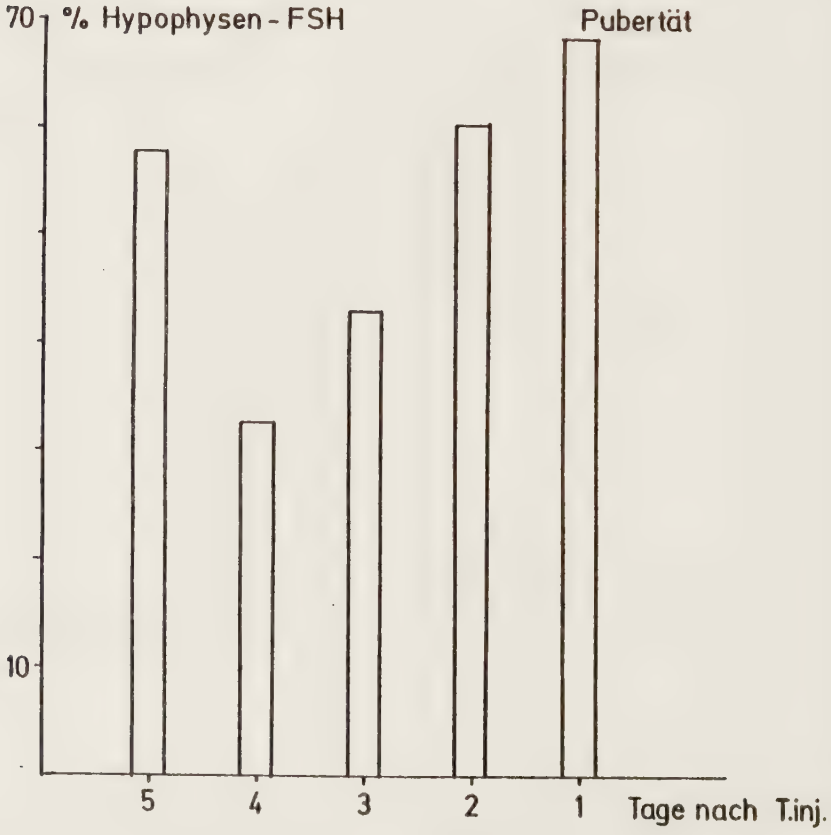



Abb. 14: Vergleich der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei pubertären Ratten

m) Einfluß des Testosterons auf die FSH - Hypophysenkonzentration bei erwachsenen männlichen Ratten

Hier fällt der FSH - Wert am ersten Tag auf 75 %, steigt am zweiten Tag auf 95 % an, und am dritten Tag kommt es wieder zu einem Absinken auf 45 %. Nachdem sich am vierten Tag wieder ein Anstieg auf 57 % zeigt, fällt der Wert fünf Tage nach Testosterongabe schließlich auf 48 % des Kontrollwertes ab.

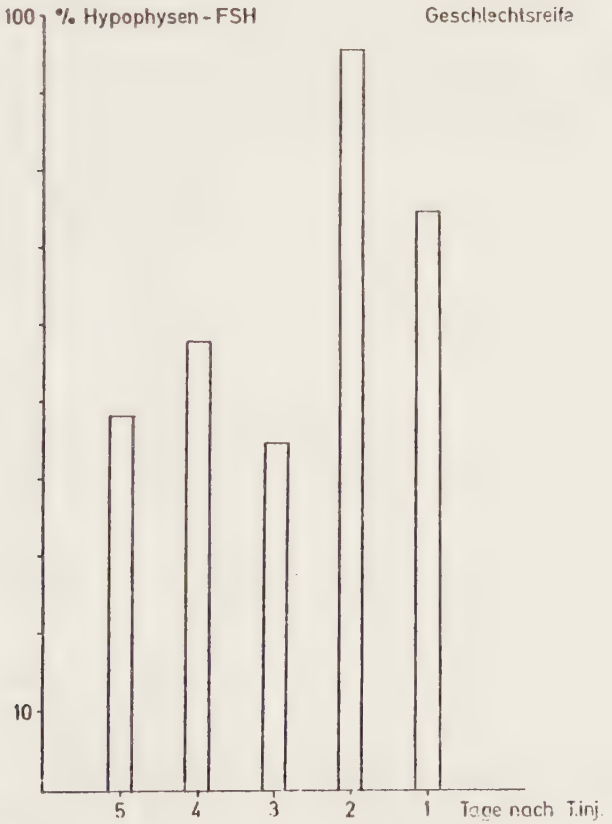



Abb. 15: Vergleich der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock mit Kontrollkonzentration bei erwachsenen Ratten

A. LH - Serumspiegel nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe

Betrachten wir zunächst den Effekt des Testosterons bei infantilen männlichen Ratten, so sehen wir, daß ein und zwei Tage nach Testosterongabe der LH - Spiegel geringfügig gesenkt wird. Drei Tage später liegt er sogar höher als der Kontrollwert, und erst am vierten und besonders am fünften Tag kommt es zur deutlichen Supprimierung des LH- - Wertes im Serum. Clomiphen verursacht dagegen schon vom ersten Tag an eine deutliche Supprimierung mit leichtem Anstieg am zweiten Tag. Es kann an keinem Tag den LH - Wert über den des Testosterons anheben.

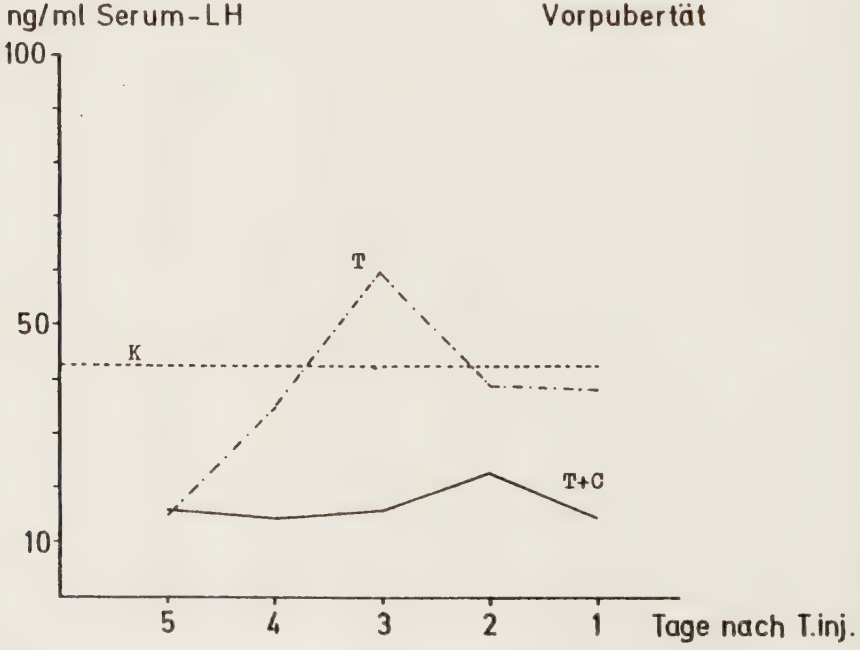



Abb. 16: Änderung des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den pubertären männlichen Ratten dagegen kommt es durch Testosteron zu einer starken Dämpfung des LH - Serumspiegels. Nach Clomiphengabe ändert sich an der zuvor beobachteten, durch Testosteron hervorgerufenen Supprimierung des LH - Wertes nichts.

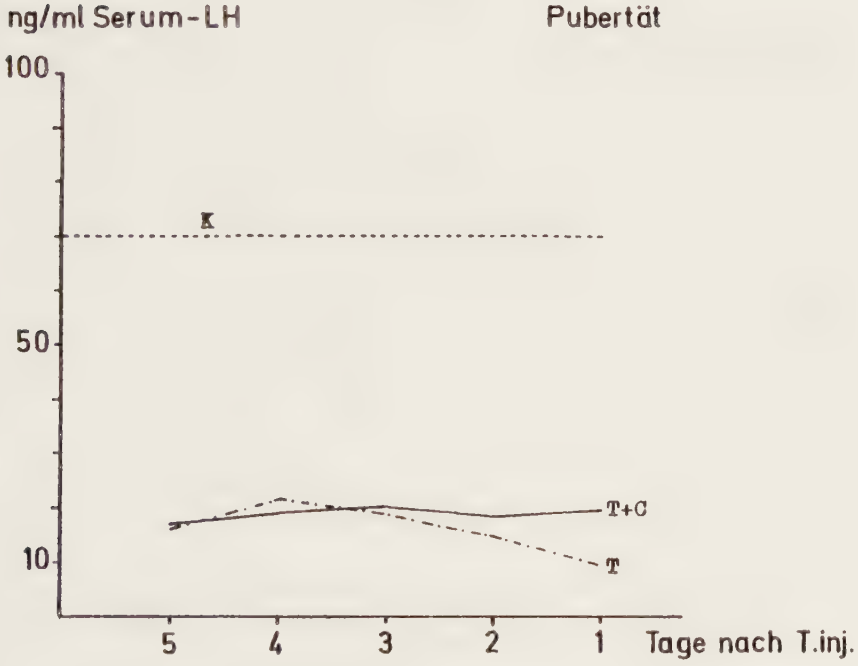



Abb. 17: Änderung des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den erwachsenen Tieren schließlich wird der gleiche Effekt beobachtet: durch die negative Rückkopplung des Testosterons wird der Serum - LH - Spiegel wieder deutlich gesenkt, und zwar vom ersten Tag nach Testosteronapplikation an. Clomiphen zeigt keine Wirkung gegenüber jener des Testosteronblocks.

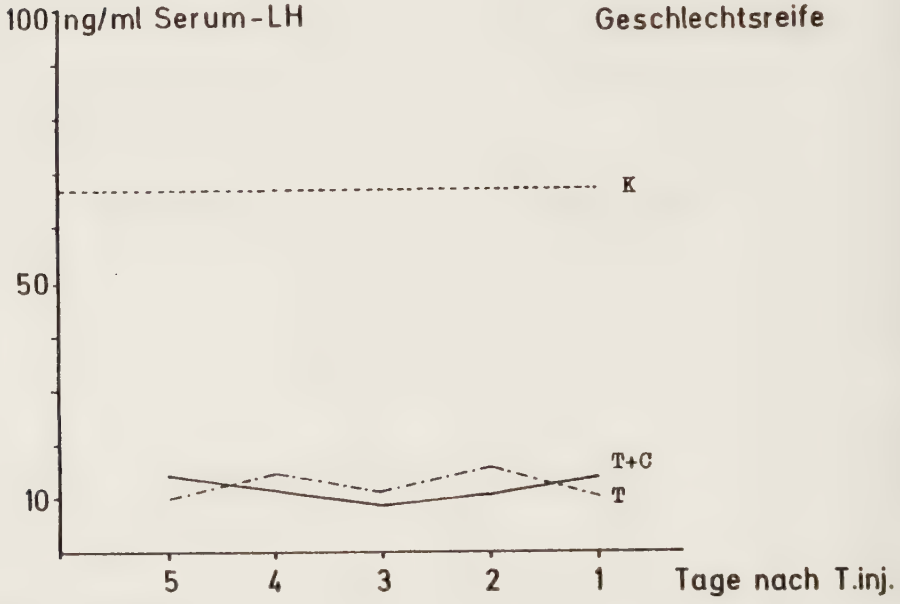



Abb. 18: Änderung des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

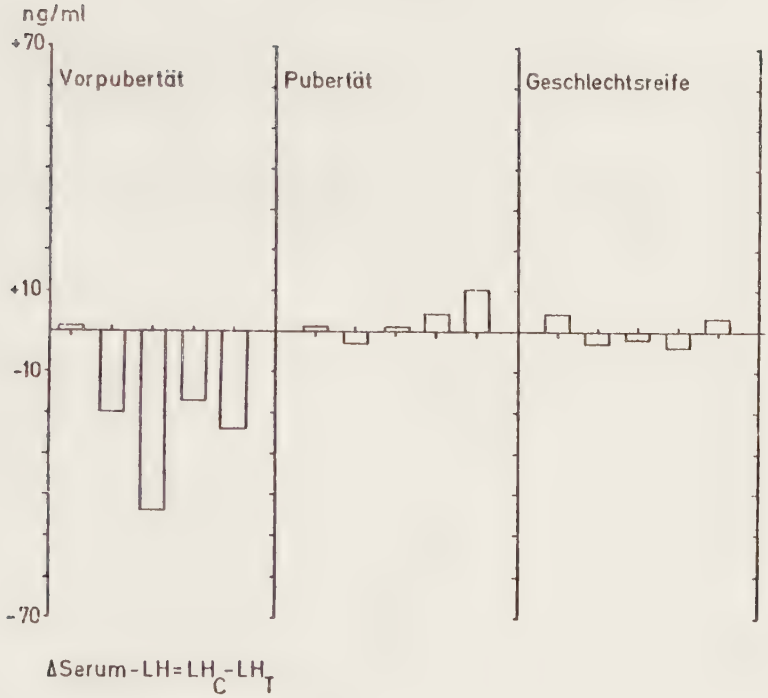



Abb. 19: Absolute Konzentrationsänderung des LH - Serumspiegels nach Testosteronblock und anschließender Clomiphenbehandlung

B. LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe

Die Hypophysenkonzentration an LH bei infantilen männlichen Ratten wird bereits einen Tag nach Testosteronbehandlung weit unter den Kontrollspiegel gesenkt, erreicht am vierten Tag ein Minimum und steigt am fünften Tag wieder ganz leicht an. Auch nach Clomiphengabe beobachtet man eine Supprimierung der LH - Konzentration mit einem Minimum am vierten Tag.

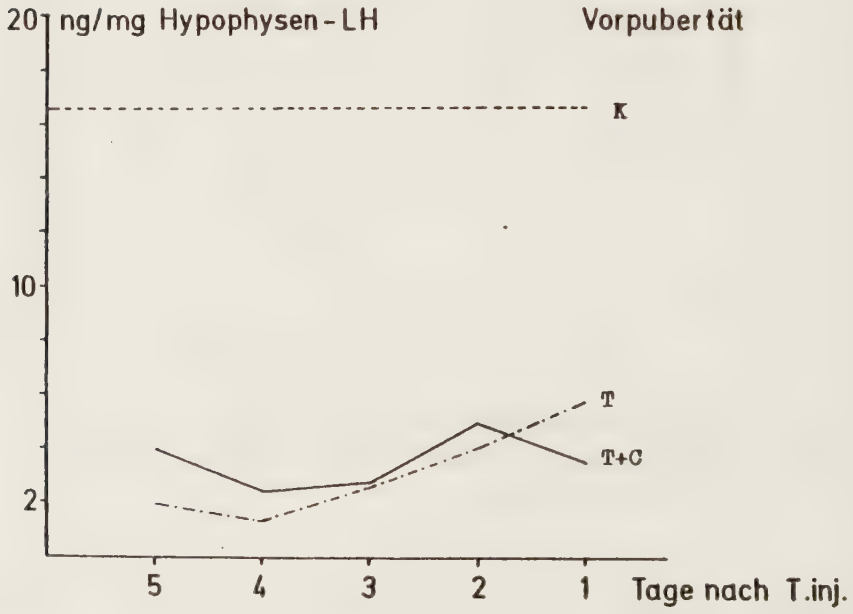



Abb. 20: Änderung der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den pubertären Tieren wird eine starke Senkung des Hypophysengehalts an LH beobachtet, die am vierten Tag ihr Maximum erreicht. Nach Clomiphengabe liegt die LH - - Konzentration zunächst nahe dem Kontrollspiegel und wird erst vom zweiten Tag an gesenkt, jedoch nicht so weit wie durch Testosteron.

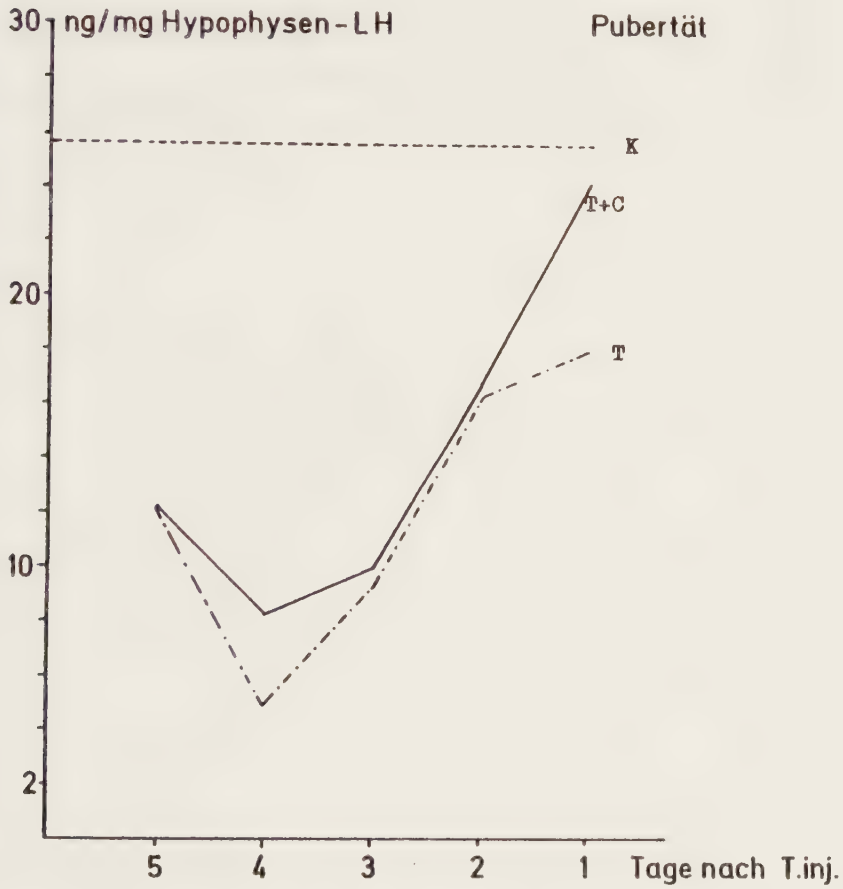



Abb. 21: Änderung der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphen-behandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den erwachsenen Tieren zeigt sich zunächst ein Absinken, am zweiten Tag allerdings eine Steigerung der LH - - Konzentration etwas über den Kontrollwert. Vom dritten Tag an kommt es zu einer Dämpfung, die fünf Tage nach Testosteronbehandlung den niedrigsten Wert erreicht. Auch nach Clomiphenapplikation kommt es am zweiten Tag zu einem geringen Anstieg des LH - Wertes über den Kontrollspiegel. Am dritten Tag ist die Supprimierung der LH - Konzentration stärker, am vierten und fünften Tag nicht so stark ausgeprägt wie nach Testosteroninjektion.

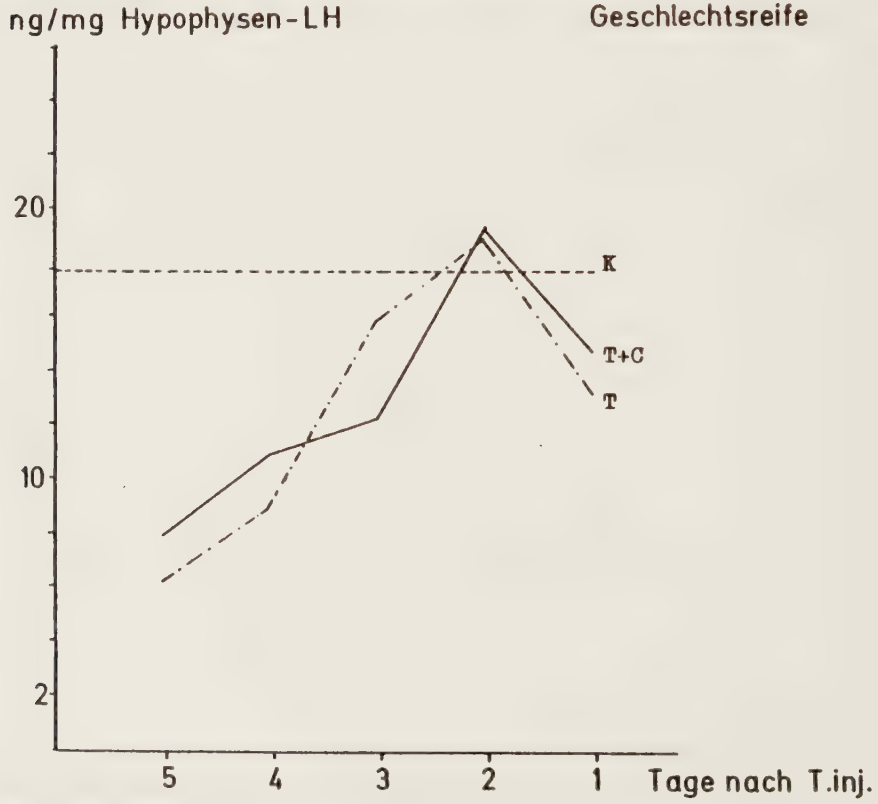



Abb. 22: Änderung der LH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

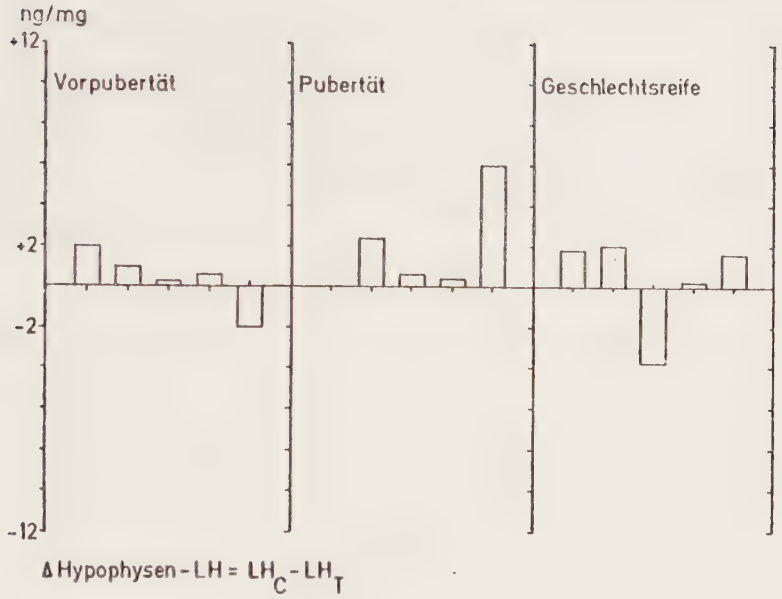



Abb. 23: Absolute Änderung der Hypophysenkonzentration an LH nach Testosteronblock und anschließender Clomiphenbehandlung

C. FSH - Serumspiegel nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe

Nach Testosterongabe beobachtet man bei infantilen männlichen Ratten eine Dämpfung des FSH - Spiegels, die allerdings nur wenig unter dem Kontrollwert liegt, aber umso ausgeprägter ist, je länger die Testosterongabe zurückliegt. Clomiphen senkt den FSH - Spiegel am stärksten vier Tage nach Testosteronbehandlung.

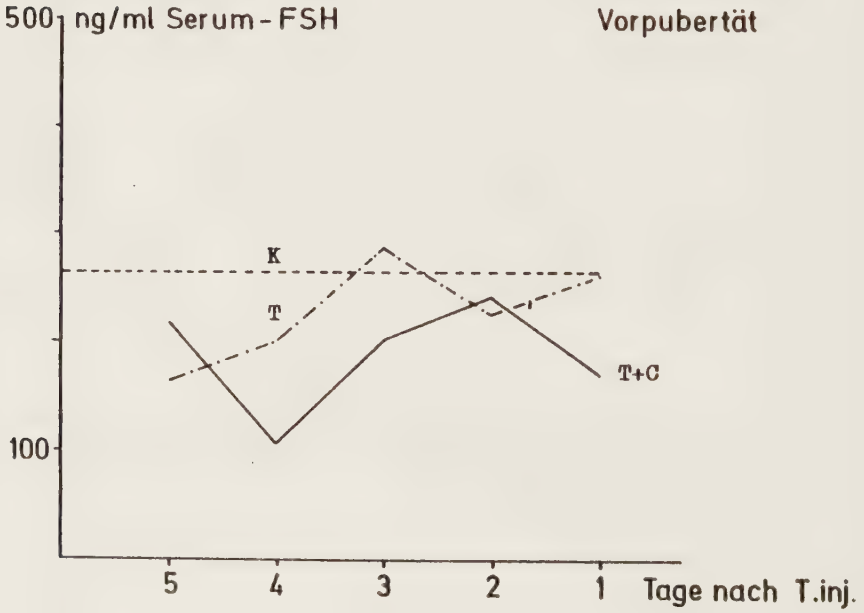



Abb. 24: Änderung des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den pubertären Tieren zeigt sich die Senkung der FSH - - Konzentration am deutlichsten am vierten Tag, wobei der Effekt jedoch nicht so ausgeprägt ist wie bei der Supprimierung des LH - Serumspiegels. Clomiphen senkt den FSH - - Gehalt im Serum etwas mehr und erreicht ebenfalls am vierten Tag ein Minimum.

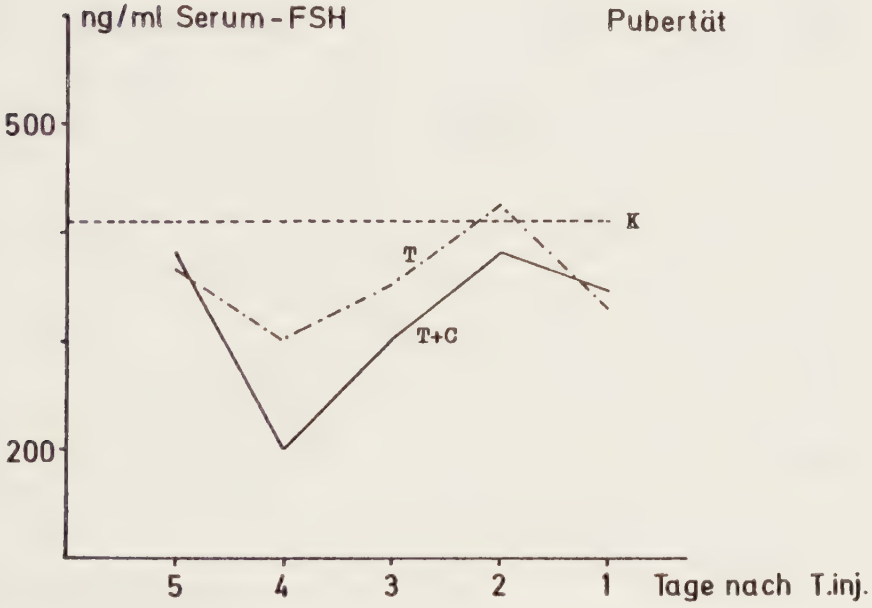



Abb. 25: Änderung des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Der Testosteronblock ist bei den erwachsenen Tieren erst am dritten und vierten Tag deutlich, während an den ersten beiden Tagen kein wesentlicher Effekt des feed back - - Mechanismus zu erkennen ist. Clomiphen ruft wieder am vierten Tag die stärkste Dämpfung des FSH - Gehaltes im Serum hervor.

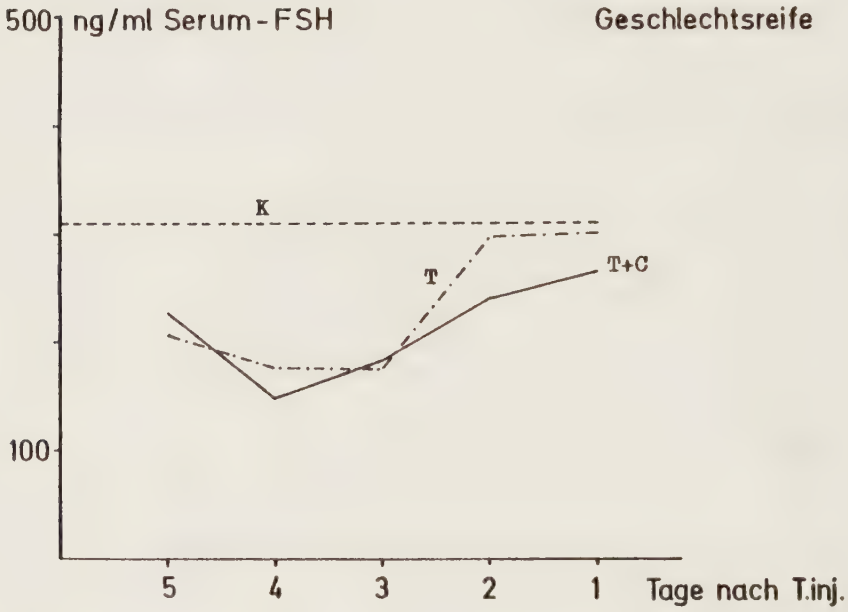



Abb. 26: Änderung des FSH - Serumspiegels nach Testosteron-block (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C)
K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

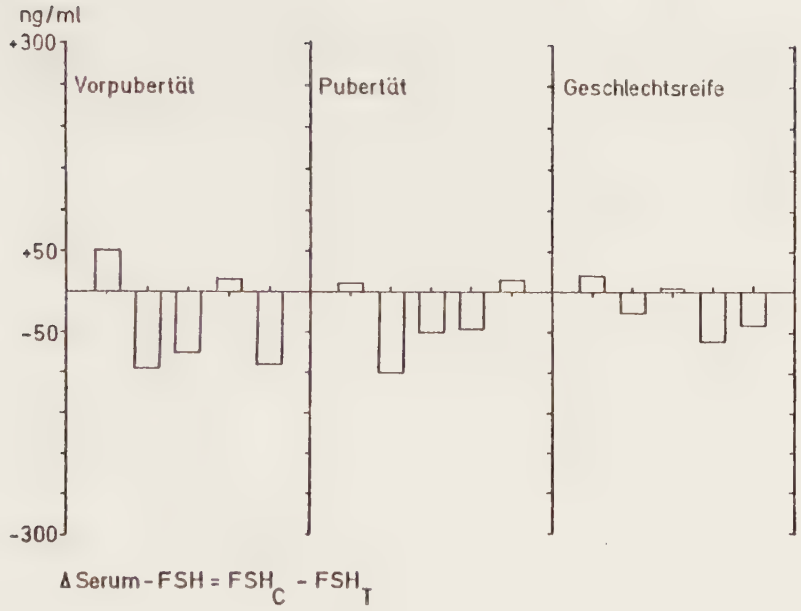



Abb. 27: Absolute Änderung des FSH - Serumspiegels nach Testosteronblock und anschließender Clomiphen-behandlung

D. FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronbehandlung und anschließender Clomiphengabe

In der Hypophyse wird die FSH - Konzentration bei den präpubertären Tieren am ersten bis fünften Tag nach Testosteronverabreichung etwa gleich stark gesenkt. Die Wirkung des Clomiphens entspricht vom zweiten bis fünften Tag ungefähr der Supprimierung durch Testosteron. Nur einen Tag nach Testosterongabe verursacht Clomiphen einen Anstieg des FSH - Gehaltes in der Hypophyse.

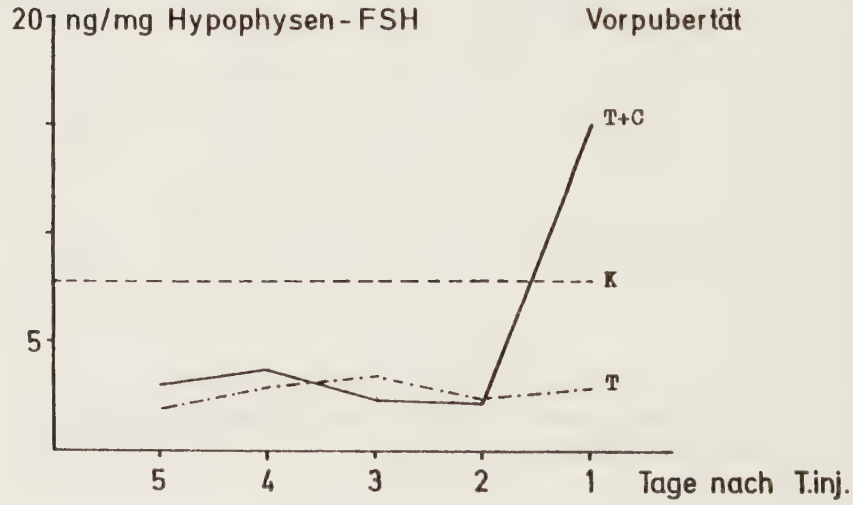



Abb. 28: Änderung der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Bei den pubertären Ratten kommt es wieder durch den negativen feed back des Testosterons zu einer deutlichen Senkung der FSH - Konzentration mit einem Minimum am vierten Tag. Nach Clomiphenbehandlung liegt der FSH - Gehalt am ersten und dritten Tag nahe der Konzentration bei unbehandelten Tieren, während es an den übrigen Tagen zu einer Senkung des FSH - Gehaltes kommt.

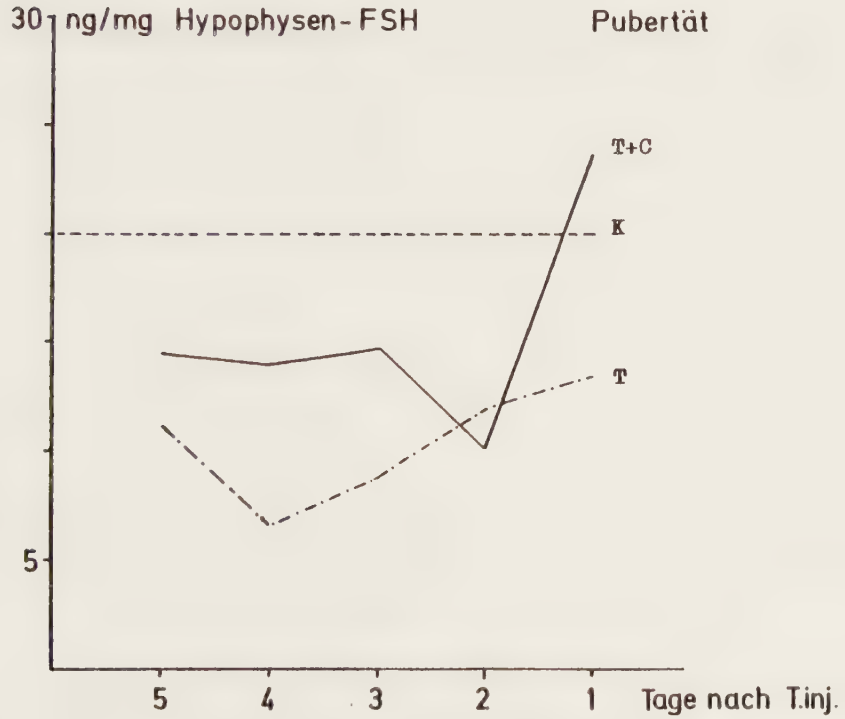



Abb. 29: Änderung der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

Die erwachsenen Ratten zeigen nach Androgengabe vom dritten bis fünften Tag eine ausgeprägte Dämpfung der FSH - - Konzentration. Nur am zweiten Tag liegt der Wert nahe der Kontrollkonzentration. Die Clomiphenwirkung zeigt kein wesentlich anderes Ergebnis als der Testosteronblock.

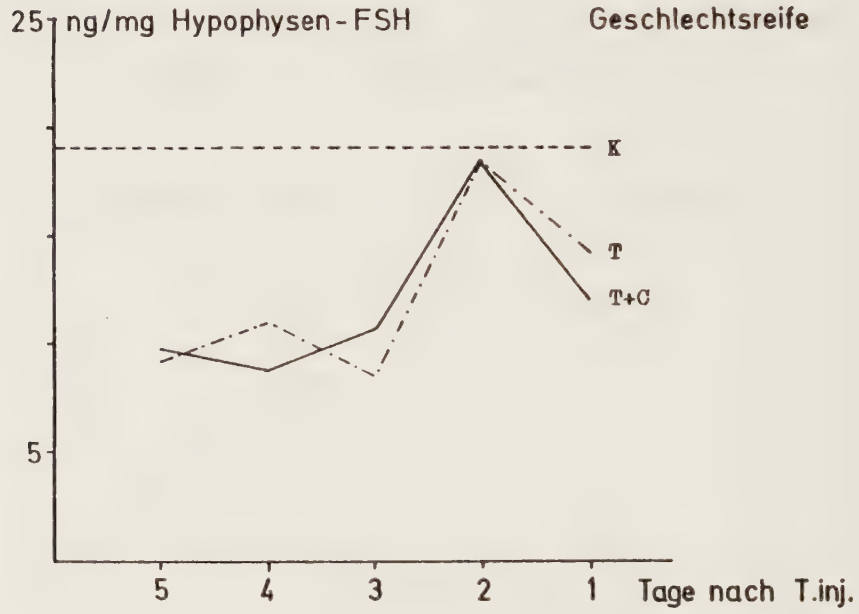



Abb. 30: Änderung der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock (T) und folgender Clomiphenbehandlung (T+C); K = Kontrollwert der unbehandelten Gruppe

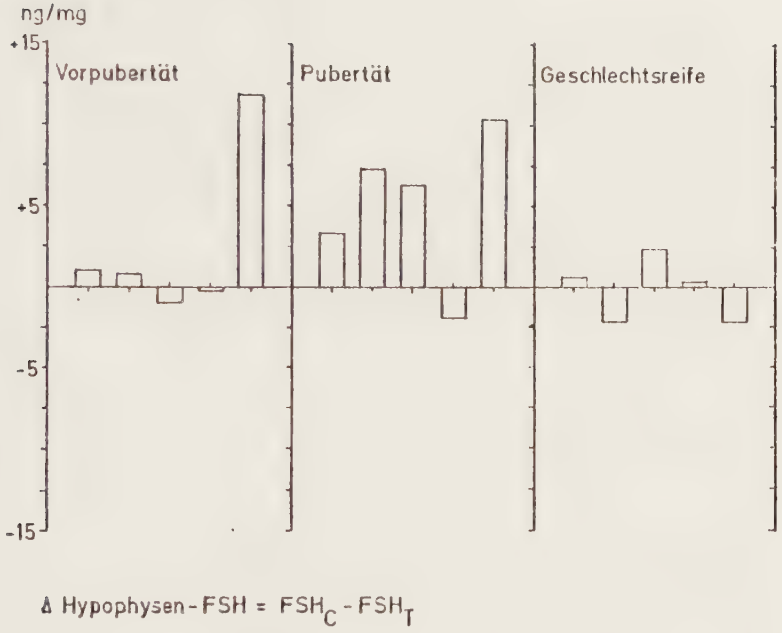



Abb. 31: Absolute Änderung der FSH - Hypophysenkonzentration nach Testosteronblock und anschließender Clomiphenbehandlung

## D i s k u s s i o n

Die LH - und FSH - Serumspiegel werden bei den präpubertären, pubertären und erwachsenen Ratten durch Testosteronbehandlung unter den Kontrollspiegel gesenkt, wie dies wegen des negativen Rückkopplungsmechanismus zu erwarten ist. Vergleicht man den Testosteroneffekt auf LH und FSH, so fällt auf, daß die Supprimierung des FSH bei allen drei Altersstufen nicht so ausgeprägt ist wie bei LH. Auch Swerdloff et al. [34] fanden, daß Testosteron stärker die LH - als die FSH - Sekretion unterdrückt. Die unterschiedliche Testosteronwirkung wird beim Vergleich der Hypophysenkonzentrationen an LH und FSH nicht so deutlich. Betrachtet man den Gonadotropingehalt in der Hypophyse nach Testosterongabe, so fällt auf, daß die LH - Konzentration bei den präpubertären Versuchstieren schon einen Tag nach Steroidinjektion auf 35 % des Kontrollwertes absinkt. Je länger die Behandlung zurückliegt, umso stärker fällt der Wert ab. Bei den pubertären und erwachsenen Tieren dagegen kommt es zu einem weit geringeren Abfall der LH - Konzentration. Ähnlich verhält sich FSH, dessen Hypophysenkonzentration bei den präpubertären Tieren nach Testosteronverabreichung am stärksten sinkt. Diese Beobachtung könnte für die Hypothese sprechen, daß in der Vorpubertät die Empfindlichkeit der Hypothalamus - Hypophysen - Gonadenachse extrem hoch ist und somit schon geringe Mengen von Gonadenhormon für eine Supprimierung der Gonadotropine ausreichen. Dies würde auch mit den Ergebnissen von Negro Vilar [19] übereinstimmen, die zeigen, daß die Empfindlichkeit der Hypothalamus - Hypophyseneinheit auf Testosteron während der Geschlechtsreife sinkt. Es wäre zwar auch denkbar, daß der Testosteronabbaumechanismus vor der Pubertät noch nicht voll funktionsfähig ist und somit höhere Steroidserumspiegel entstehen als bei der gleichen Behandlung von erwachse-

nen Tieren. Gupta et al. [9,12] konnten zeigen, daß die Umwandlung von Testosteron in seine wirksamere 5 - reduzierte Form nicht altersabhängig ist.
Würde Testosteron nur auf die im Hypothalamus gelegenen negativen feed back - Zentren wirken [35] und LH - RH hemmen, so wäre der LH - und FSH - Serumspiegel zwar niedrig, aber der Gehalt in der Hypophyse wäre hoch, da es zu keiner Ausschüttung der Gonadotropine kommt. Die Konzentration an LH und FSH in der Hypophyse liegt jedoch unter dem Kontrollwert. Man darf also vermuten, daß Testosteron auch direkt hemmend auf die Synthese der Gonadotropine in der Hypophyse einwirkt. Schally [26] fand bei seinen Untersuchungen, daß Testosteron durch seine direkte Wirkung auf das Hypophysengewebe die Antwort auf LH - RH hemmt. Würde die Synthese unabhängig von äußeren Faktoren durch einen Regulationsmechanismus innerhalb der Hypophyse gesteuert, so müßte nach Hemmung der Ausschüttung ein höherer Gonadotropingehalt der Hypophyse resultieren.
Der Gehalt an gonadotropen Hormonen im Serum nimmt bei allen drei Altersgruppen vier Tage nach Testosterongabe am ausgeprägtesten ab. Es wäre vorstellbar, daß dann die höchste Konzentration des Testosteronmetaboliten DHT erreicht ist, welcher weit wirksamer die FSH - und LH - Sekretion durch seinen inhibitorischen Effekt auf LH -RH hemmt [26].
Beim Vergleich der Hypophysenwerte mit denen des Serums würde man bei einem Maximum der Serumspiegel ein Minimum der Hypophysenkonzentrationen erwarten. Es zeigt sich aber kein eindeutig spiegelbildliches Verhalten der Kurven.
Wird nun Clomiphencitrat verabreicht, nachdem eine Testosteronbehandlung vorausgegangen ist, zeigt sich bei allen drei Altersgruppen keine signifikante Wirkung. Eigentlich hätte man eine Steigerung der LH - und FSH - Konzentration erwartet, da Clomiphen die Gonadotropinausschüttung stimuliert. Ähnliche Beobachtungen machten Bardin et al. [1].
Bei Männern, die mit Fluoxymesteron behandelt worden waren, oder die einen Hypopituitarismus hatten, zeigte Clomiphen keine Wirkung. Bei unbehandelten Männern aber führte Clomi-

phen zu einem Anstieg des LH - und Testosteronserumspiegels.
Es wäre nun denkbar, daß Clomiphen mit den gleichen Rezeptoren im Hypothalamus reagiert wie Testosteron. Ist die Testosteronkonzentration im Serum niedrig bzw. im physiologischen Bereich, so sind nur wenige feed back - Rezeptoren von dem Steroidhormon besetzt, und Clomiphen kann mit den freien Rezeptoren reagieren. Durch die Bindung des Clomiphens an die Rezeptoren kann Testosteron seine negativ rückkoppelnde, die gonadotropinsupprimierende Wirkung nicht mehr ausüben, und es kommt zur vermehrten Gonadotropinausschüttung. Ist der Testosteronspiegel im Serum dagegen hoch, wie in dem Versuch der vorliegenden Arbeit, in welchem die Versuchstiere mit Testosteronpropionat behandelt worden sind, so sind die Hypothalamusrezeptoren von Testosteron besetzt. Deshalb kann Testosteron seine gonadotropindämpfende Wirkung entfalten und Clomiphen nicht mehr angreifen. Es scheint also eine Konkurrenz zwischen Testosteron und Clomiphen zu bestehen. Die Clomiphengabe nach vorausgegangener Testosteronbehandlung verursacht eine etwa gleich stark ausgeprägte Senkung des LH - Serumspiegels wie die alleinige Testosterongabe. Dagegen fällt der FSH - - Spiegel im Serum nach Testosteronverabreichung und anschließender Clomipheninjektion meistens weiter ab als wenn nur Testosteron gegeben wird. Es läßt sich aber kein signifikant unterschiedliches Verhalten nach Testosteronverabreichung mit anschließender Clomiphenbehandlung gegenüber FSH und LH zeigen.

## Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde einmal untersucht, wie lange der Testosteronblock bei infantilen, pubertären und erwachsenen Ratten anhält, denen 25 mg/kg Körpergewicht Testosteronpropionat verabreicht worden ist. Außerdem wurde die Wirkung von Clomiphen bei den verschiedenen Altersgruppen nach Testosteronblock gezeigt.
Die Hypothese, daß während der Geschlechtsreifung die Empfindlichkeit der Hypothalamus - Hypophysen - Gonaden - - Achse abnimmt, konnte bestätigt werden. Die negative Rückkopplung von Testosteron scheint nicht nur auf den Hypothalamus und das LH - Releasing - Hormon zu wirken, sondern auch direkt auf die Hypophyse.
Der ausgeprägteste Testosteronblock zeigte sich vier Tage nach Testosteronverabreichung bei den Serum - und Hypophysenwerten. Diese Beobachtung wurde so gedeutet, daß nach diesem Zeitraum die größte Menge des Testosterons in seinen wirksameren Metaboliten Dihydrotestosteron umgewandelt worden ist.
Es zeigte sich weiter, daß Testosteron den LH - Serumspiegel deutlicher senkt als den FSH - Spiegel. Der Unterschied der Hypophysenkonzentrationen beider gonadotroper Hormone war nicht so eindeutig.
Clomiphen zeigte nach vorausgegangener Testosteronbehandlung keine wesentliche Änderung gegenüber der Supprimierung der LH - Spiegel im Serum und in der Hypophyse, hervorgerufen nur durch Testosterongabe. Bei FSH - Serum - und Hypophysenwerten war teilweise eine stärkere Senkung als nach alleiniger Testosteronbehandlung zu beobachten. Man kann also sagen, daß Clomiphen bei hohen Androgenspiegeln unwirksam bleibt.

## L i t e r a t u r

1) Bardin, C.W., Ross, G.T., Lipsett, M.B.:
Site of Action of Clomiphene Citrate in Men: A Study of the Pituitary - Leydig Cell Axis
J.Clin.Endocr. 27, 1558 (1967)

2) Burr, I.M., Sizonenko, P.C., Kaplan, S.L., Grumbach, M. M.: Pediatr.Res. 4, 25 (1970)

3) Dierschke, D.J., T. Yamaji, F.J. Karsch, R.F. Weick, G. Weiss and E. Knobil:
Blockade by Progesterone of Estrogen - Induced LH and FSH Release in the Rhesus monkey.
Endocrinology 92, 1496 (1973)

4) Donovan, B.T.: Neuroendokrinologie der Säugetiere, 152, Thieme - Verlag, Stuttgart, 1973

5) Donovan, B.T., van der Werff ten Bosch, J.J.:
Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions
Nature 178, 745 (1956)

6) Donovan, B.T., van der Werff ten Bosch, J.J.:
The hypothalamus and sexual maturation in the rat
J.Physiol. 147, 78 (1959)

7) Donovan, B.T., van der Werff ten Bosch, J.J.:
Physiology of Puberty, Arnold, London, 1965

8) Grumbach, M.M. in:
Control of onset of Puberty
Eds.: Grumbach, M.M., G.D. Grave and F.E. Mayer, Wiley & Sons, New York, 1974

9) Gupta, D.:
Hypothalamic control of the mammalian sexual maturation, Lecture, Vienna 1976

10) Gupta, D.,in :
Recent Progress in Reproductive Endocrinology
Eds.: P.G. Crossignani, V.H.T. James, Academic Press, London, 1974

11) Gupta, D., in:
Hypothalamic Hormones - Structure, Synthesis and Bio-

logical Activity, Eds.: D. Gupta and W. Voelter, Verlag Chemie, Weinheim, 1975

12)Gupta, D., in :
Current Topics on Hypothalamic Hormones, Eds.: D. Gupta and W. Voelter, Verlag Chemie, Weinheim (in Press)

13)Gupta, D., K. Rager and M. Eichner,
J.Endocr. 66, 183 (1975)

14)Harris, G.W.:
Neural Control of the Pituitary Gland, Arnold, London, 1955

15)Harris, G.W., Jacobsohn, D.:
Functional grafts of the anterior pituitary gland
Proc.Roy.Soc.B 139, 263 (1952)

16)Hohlweg, W., Junkmann, K.:
Die hormonal - nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens
Klin.Wochenschr. 11, 321 (1932)

17)Kelch, R.P., Kaplan, S.L., Grumbach, M.M.,
Pediatr.Res. 6, 354 (1972)

18)Kulin, H.E., Grumbach, M.M., Kaplan, S.L.:
Gonadal - hypothalamic interaction in prepubertal and pubertal man: effect of clomiphene citrate on urinary follicle - stimulating hormone and luteinizing hormone and plasma testosterone
Pediatr.Res. 6, 162 (1972)

19)Negro-Vilar, A., S.R. Ojeda and S.M. McCann:
Evidence for Changes in Sensitivity to Testosterone Negative Feedback on Gonadotropin Release during Sexual Development in the Male Rat
Endocrinology 93, 729 (1973)

20)Odell, W.D., Ross, G.T., Rayford, P.L.:
Radioimmunassay for luteinizing hormone in human plasma or serum: physiologic studies
J.Clin.Invest. 46, 248 (1967)

21)Odell, W.D., Swerdloff, R.S., in:
Control of Onset of Puberty, Eds.: Grumbach, M.M., G.D. Grave and F.E. Mayer, Wiley & Sons, New York, 1974

22)Ramirez, V.D., in:
Handbook of Physiology, Ed.: O.R.Greep,(in press)
23)Ramirez, V.D., McCann, S.M.,
Endocrinology 72, 452 (1965)
24)Ryan, R.J.,
J.Clin.Endocr. 22, 300 (1962)
25)Saffran, M., A.V. Schally and B.P. Benfey:
Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophyseal factor,
Endocrinology 57, 439 (1955)
26)Schally, A.V., T.W. Redding and A. Arimura:
Effect of Sex Steroids on Pituitary Responses to LH - and FSH - Releasing Hormone in vitro
Endocrinology 93, 893 (1973)
27)Schally, A.V., C.Y. Bowers, W.F. White and A.I. Cohen:
Purification and in vivo and in vitro studies with porcine luteinizing hormone - releasing factor
Endocrinology 81, 77 (1967)
28)Schally, A.V., T. Saito, A. Arimura, S. Sawano, C.Y. Bowers, W.F. White and A.I. Cohen:
Purification and in vitro and in vivo studies with porcine hypothalamic follicle - stimulating hormone - releasing factor
Endocrinology 81, 882 (1967)
29)Schally, A.V., E.E. Müller and S. Sawano:
Effect of porcine growth hormone - releasing factor on the release of synthesis of growth hormone in vitro
Endocrinology 82, 271 (1968)
30)Schally, A.V., A. Arimura, C.Y. Bowers, I. Wakabayshi, A.J. Kasting, T.W. Redding, J.C. Mittler, R.M.G. Nair,P. Pizzolato and A.J. Segal:
Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin
J.Clin.Endocrin. 31, 291 (1970)
31)Schally, A.V., A. Arimura, C.Y. Bowers, A.J. Kastin, S. Sawano and T.W. Redding:
Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary

function
Recent Progr. Hormone Res. 24, 497 (1968)
32)Smith, E.A., Davidson, J.M.:
Amer.J.Physiol. 212, 1385 (1967)
33)Swerdloff, R.S., H.S. Jacobs and W.D. Odell in:
Saxena, B.B., Beling, C.G., and H.M. Gandy (eds.),
Gonadotropins, Wiley - Interscience, New York, 1972
34)Swerdloff, R.S., P.C. Walsh and W.D. Odell,
Steroids 20, 13 (1972)
35)Turner, J.W.jr:
Effect of Hypothalamic Lesions and Androgen on Plasma
LH Levels in Castrated Male Gerbils
Endocrinology 92, 227 (1973)
36)Ulrich, R.S., Kent, J.R.:
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128, 1093 (1968)
37)van der Werff ten Bosch, J.J.:
Isosexual precocity, in: Endocrine and genetic diseases
of childhood, L. Gardner and W.B. Saunders(eds.),
Philadelphia and London, 1969

# L e b e n s l a u f

Am 12. Januar 1948 wurde ich, Helga Bertram geb. Raus, als Tochter des Bundesbahnoberinspektors Heinrich Raus und seiner Ehefrau Helene geb. Odstrcil in Ingersheim, Kreis Ludwigsburg, geboren.
Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Grundschule in Bietigheim und wechselte 1958 auf das Gymnasium in Bietigheim über. Von 1963 an besuchte ich das Mädchengymnasium in Sigmaringen, an dem ich am 15.Oktober 1966 die Reifeprüfung ablegte.
Im November 1966 begann ich meine Ausbildung als Apothekerpraktikant, die ich mit der Pharmazeutischen Vorprüfung in Stuttgart abschloß. Im Wintersemester 1968/69 nahm ich das Pharmaziestudium an der Universität Marburg auf. Vom Sommersemester 1969 an setzte ich das Studium an der Universität Tübingen fort, an der ich im Oktober 1971 das Pharmazeutische Staatsexamen ablegte.
Im März 1972 begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff im Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen mit der Dissertation " Über Farbreaktionen mit Vanillin-Schwefelsäure ", die ich im September 1973 abschloß.
Im April 1972 heiratete ich den Apotheker Dr. Jürgen Bertram.
Im Wintersemester 1973/74 wurde ich zum Medizinstudium an der Universität Tübingen zugelassen. Im März 1975 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1976 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Im Sommersemester 1976 begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. D. Gupta an der Kinderklinik der Universität Tübingen die Dissertation " Die Wirkung von Clomiphen auf die Synthese und Ausschüttung der Gonadotropine bei androgenbehandelten männlichen Ratten ", die ich im Sommersemester 1977 abschloß.

Im Frühjahr 1978 legte ich an der Universität Tübingen den zweiten Abschnitt, am 8. Mai 1979 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.